

Université de Sherbrooke

Le rôle de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans la cancérogenèse colorectale humaine

Par
Jean-François Groulx
Programmes de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Août 2014

Membres du jury d'évaluation
Professeur Jean-François Beaulieu, biologie cellulaire
Professeur Fernand-Pierre Gendron, Biologie cellulaire
Professeure Sophie Roux, Médecine
Professeur Jacques Huot, CRCHI, Université Laval

Publications

Une partie des résultats présentés dans cette thèse de doctorat ont fait l'objet de publication dans une revue scientifique avec comité de révision par les pairs.

Groulx, J.-F., Giroux, V., Beauséjour, M., Boudjadi, S., Basora, N., Carrier, J.C., Beaulieu, J.-F., 2014. Integrin $\alpha6A$ splice variant regulates proliferation and the Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*.

Groulx, J.-F., Khalfaoui, T., Benoit, Y.D., Bernatchez, G., Carrier, J.C., Basora, N., Beaulieu, J.-F., 2012. Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy* 8, 893–902.

Financement reçu pour les travaux de recherche au doctorat

1. Bourse de doctorat du centre de recherche clinique Étienne-Le Bel
2. Bourse institutionnelle au doctorat de l'Université de Sherbrooke
3. Bourse de doctorat du FRQS

La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre....

-Albert Einstein

RÉSUMÉ

Rôle de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans la cancérogenèse colorectale humaine

Par

Jean-François Groulx

Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par le cancer en Amérique du Nord. Il a été démontré que l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est surexprimée dans les tumeurs primaires colorectales et qu'elle a un rôle protumoral. Toutefois, deux variants d'épissage alternatif existe pour la sous-unité intégrine $\alpha 6$ soit, $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$. Ils possèdent des domaines cytoplasmiques différents laissant croire qu'ils ont également des fonctions différentes. De plus, dans le cancer colorectal humain, une augmentation du ratio des variants $\alpha 6A/\alpha 6B$ est observée, suggérant ainsi que le variant $\alpha 6A$ participerait à la fonction protumorale de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$. Toutefois, le rôle précis du variant $\alpha 6A$ et sa régulation dans le cancer colorectal humain demeurent inconnus. Les travaux de recherche de cette thèse visent à identifier le rôle du variant $\alpha 6A$ dans la carcinogenèse colorectale humaine, en plus de comprendre la régulation de son expression. Dans un premier temps, mes expériences ont confirmé qu'une augmentation du variant $\alpha 6A$ est responsable de la surexpression de la sous-unité $\alpha 6$ observée dans le cancer colorectal humain. L'abolition spécifique de ce variant par shARN dans les cellules cancéreuses colorectales humaines a entraînée un ralentissement de la prolifération cellulaire, démontré par les expériences de croissance cellulaire et d'incorporation de BrdU. De plus, cette réduction de la prolifération cellulaire est accompagnée d'une répression importante de la voie Wnt/ β -caténine, visualisée par la baisse de la β -caténine active, de sa localisation nucléaire et de son activité transcriptionnelle. La suppression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules cancéreuses colorectales humaines diminue leur capacité à développer des tumeurs en xénogreffe. Les analyses supplémentaires du mécanisme ont permis de constater que le variant $\alpha 6A$ régule la voie Wnt/ β -caténine par la dégradation autophagique de la protéine DVL2. De plus, la protéine PRICKLE1, un important médiateur de l'ubiquitination et la dégradation de DVL2, est augmentée par la suppression du variant $\alpha 6A$. Par ailleurs, une forte corrélation positive entre l'expression du variant $\alpha 6A$ et MYC a été observée *in vitro* et *in vivo*. Mes travaux ont révélé que MYC contrôle l'expression du promoteur de la sous-unité $\alpha 6$ et qu'il favorise l'épissage de l'exon 25. Conséquemment, MYC régulerait l'expression du variant $\alpha 6A$ par les facteurs d'épissage ESRP2 et HNRNPA2B1. Ces découvertes démontrent le potentiel de l'utilisation du variant $\alpha 6A$ et de son mécanisme comme cible thérapeutique et outil diagnostique.

Mots clés : Intégrine $\alpha 6 \beta 4$, variant $\alpha 6A/\alpha 6B$, épissage alternatif, cancer colorectal, Wnt/ β -caténine, DVL, autophagie, MYC, prolifération.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations	x
1 1. Introduction.....	1
1.1 Le système intestinal et le côlon.....	1
1.2 La membrane basilaire.....	2
1.3 L'épithélium du côlon	2
1.4 Le cancer colorectal.....	5
1.5 La voie Wnt/ β -caténine	6
1.6 Le proto-oncogène MYC.....	9
1.7 L'épissage alternatif.....	12
1.8 Les intégrines.....	13
1.9 L'intégrine $\alpha 6 \beta 4$	18
1.10 La signalisation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans le cancer	19
1.11 Les variants de la sous-unité intégrine $\beta 4$	20
1.12 Les variants d'épissage alternatif $\alpha 6 A / \alpha 6 B$	20
1.13 L'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans le côlon et le cancer colorectal.....	22
1.14 Les hypothèses et objectifs	23
2. Matériel et méthodes	26
2.1 Anticorps primaires et matériels.....	26
2.2 Culture cellulaire	27
2.3 Génération des cellules exprimant le shARN ciblant la sous-unité intégrine $\alpha 6 A$ et le facteur d'épissage HNRNPA2B1	28
2.4 Courbe de croissance	28

2.5	Essai d'incorporation de BrdU	29
2.6	Analyse de l'apoptose par marquage enzymatique des extrémités fragmentées de l'ADN par la méthode ISEL	29
2.7	Tissus de cancer colorectal humain	30
2.8	Extraction de l'ARNm et génération des ADNc	30
2.9	Réaction de polymérase en chaine (PCR) compétitive et PCR quantitative en temps réel.....	31
2.10	Immunofluorescence	33
2.11	Immunobuvardage	34
2.12	Extraction nucléaire.....	35
2.13	Fractionnement cellulaire	36
2.14	Plasmides, transfection et essai luciférase	36
2.15	Xénogreffe	37
2.16	Traitement avec l'inhibiteur de MYC	38
2.16	Analyses statistiques.....	38
3.	Résultats.....	39
3.1	L'augmentation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de son variant $\alpha 6A$ dans les tumeurs colorectales humaines	39
3.2	L'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules cancéreuses colorectales humaines.....	41
3.3	La perte de l'expression du variant $\alpha 6A$ n'affecte pas la localisation du variant $\alpha 6B$	43
3.4	Le variant $\alpha 6A$ régule la prolifération cellulaire	45
3.5	La suppression de l'expression du variant $\alpha 6A$ réduit la croissance tumorale en xénogreffes	47
3.6	Régulation de la voie Wnt/ β -caténine le variant $\alpha 6A$	49
3.7	L'inhibition de la GSK3 β rétablit de la voie Wnt/ β -caténine.....	51
3.8	La régulation des niveaux protéiques de DVL2 par le variant $\alpha 6A$	53
3.9	L'inhibition de DVL ralentit la croissance cellulaire	55
3.10	Régulation de la dégradation autophagique de DVL2 par le variant $\alpha 6A$	55
3.11	Corrélation entre l'expression de <i>MYC</i> et le variant $\alpha 6A$ <i>in vitro</i>	58

3.12	Corrélation entre l'expression de <i>MYC</i> et de la sous-unité $\alpha 6A$ <i>in vivo</i>	60
3.13	<i>MYC</i> régule le promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$	61
3.14	Inhibition pharmacologique de <i>MYC</i> réduit l'expression du variant $\alpha 6A$	63
3.15	Régulation de l'expression de facteurs d'épissage alternatif par <i>MYC</i>	65
3.16	L'abolition de l'expression de <i>HNRNPA2B1</i> favorise l'expression du variant $\alpha 6A$	65
4.	Discussion et conclusion	68
4.1	L'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ dans les cancers	68
4.2	La régulation de la prolifération et de la voie Wnt/ β -caténine	71
4.3	Le variant $\alpha 6A$ et la dégradation autophagique de <i>DVL2</i>	75
4.4	La signalisation intracellulaire du variant $\alpha 6A$	79
4.5	La régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ par <i>MYC</i>	81
4.6	<i>MYC</i> et l'épissage alternatif de l'exon 25 du transcrit de la sous-unité $\alpha 6$	83
4.7	Implication clinique.....	85
5.	Conclusion	87
6.	Perspectives	89
7.	Remerciments.....	90
8.	Bibliographie	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation d'une structure glandulaire de l'épithélium de la glande colique.....	4
Figure 2 La voie Wnt/ β -caténine	8
Figure 3 Le réseau MYC/MAX/MAD et MIZ-1	11
Figure 4 La famille des récepteurs intégrines.....	14
Figure 5 Modèle d'activation et de signalisation des intégrines.....	17
Figure 6 Schéma de l'épissage alternatif de la sous-unité intégrine $\alpha 6$	21
Figure 7 Expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de ses variants d'épissage alternatif dans les tumeurs primaires colorectales humaines	40
Figure 8 Abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules cancéreuses colorectales humaines	42
Figure 9 Localisation du variant $\alpha 6B$ en présence de l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$	44
Figure 10 Régulation de la prolifération des lignées d'adénocarcinome colorectal par le variant $\alpha 6A$	46
Figure 11 L'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules de lignées de cancer colorectal réduit le développement de tumeur en xénogreffe.....	48
Figure 12 Régulation de la voie Wnt/ β -caténine par le variant $\alpha 6A$	50
Figure 13 L'inhibition de la GSK3 β rétablit l'activité de la voie Wnt/ β -caténine	52
Figure 14 L'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ régule la protéine DVL2	54
Figure 15 Régulation de la dégradation autophagique de DVL par le variant $\alpha 6A$	57
Figure 16 Corrélation <i>in vitro</i> entre l'expression de <i>MYC</i> et le variant $\alpha 6A$	59
Figure 17 Corrélation entre l'expression de <i>MYC</i> et $\alpha 6A$ dans les cancers colorectaux humains.....	60
Figure 18 <i>MYC</i> régule l'activité du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$	62
Figure 19 L'inhibition pharmacologique de <i>MYC</i> régule l'épissage alternatif de la sous-unité intégrine $\alpha 6$	64
Figure 20 L'inhibition de <i>MYC</i> entraîne la diminution de l'expression génique de différents facteurs d'épissage alternatif	66
Figure 21 L'abolition de l'expression du facteur HNRNPA2B1 favorise l'expression du variant $\alpha 6A$	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Caractéristiques des anticorps utilisés	27
Tableau 2 Séquences des shARN	28
Tableau 3 Séquences des amorces et sondes pour l'amplification du variant $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ en PCR quantitative	32
Tableau 4 Séquence des amorces utilisées pour l'amplification des gènes en PCR quantitative	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APC	Adenomatous polyposis coli
PAF	Polypose adénomateuse familiale
HNCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
TGF- β	Transforming growth factor beta
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
CKI	Caseine kinase 1
DVL	Dishevelled
TFC4	Transcription factor 4
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
AKT	Protein Kinase B
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
CDK	Cyclin-dependent kinases
SRSF1	Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 1
B-HLH-LZ	Domaine basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper
NMP	Nucleophosmine
MKNK2	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
snRP	Small nuclear ribonucleic particles
ESRP1/2	Epithelial Splicing Regulatory Protein 1/2
PTB1	Polypyrimidine tract binding protein 1
RGD	Arginine-glycine-aspartate
MEC	Matrice extracellulaire
FAK	Focal Adhesion Kinase

IB	Immunobuvardage
IF	Immunofluorescence
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
OptiMEM	Optimum modified Eagle's medium
EGF	Epidermal growth factor
shARN	Small hairpin acide ribonucléique
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Tampons phosphate salin (pH 7.4)
HRP	Horseradish peroxidase
KRAS	GTPase Kras
BRAF	Kinase BRAF
PRICKLE1	Prickle homolog 1
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor

1. INTRODUCTION

1.1 Le système intestinal et le côlon

Chez les mammifères, l'intestin est divisé en deux entités distinctes, soit l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle est constitué du duodénum, du jéjunum et de l'iléon dont la principale fonction est d'assurer la digestion et l'absorption des nutriments tels que des protéines, des lipides et des glucides (Thomson *et al.*, 2003). Le gros intestin est formé du cæcum, du côlon, du rectum et du canal anal. Le gros intestin est responsable de l'absorption de l'eau et des électrolytes, et de transporter les déchets sous forme de fèces par l'intermédiaire du côlon avant d'être éliminées via le rectum et le canal anal. Le côlon est divisé en quatre segments, soit le côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (Babyatsky et Podolsky, 1999). Au niveau structural, le côlon, tout comme le reste de l'intestin, est composé de quatre couches concentriques : la séreuse, la muscularis, la sous-muqueuse et la muqueuse. La séreuse est la couche externe recouvrant et protégeant l'organe, la muscularis est constituée de cellules musculaires lisses impliquées dans le péristaltisme, tandis que la sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif supportant la muqueuse (Thomson *et al.*, 2003). La muqueuse est constituée d'un épithélium simple glandulaire exposé au contenu de la lumière intestinale, reposant et interagissant avec la lamina propria. La lamina propria est un tissu conjonctif spécialisé composé de fibroblastes, de myofibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de cellules immunitaires entremêlées dans un réseau dense de collagène. Elle joue un rôle essentiel dans la fonctionnalité et l'intégrité de l'épithélium par la sécrétion de différents morphogènes et la contribution à la formation de la membrane basilaire sous-adjacente à l'épithélium (Beaulieu, 1997; C. Birchmeier et W. Birchmeier, 1993). L'épithélium et la lamina propria sont entourés d'une mince couche de cellules musculaires lisses, appelée la muscularis mucosae, permettant une séparation physique avec la sous-muqueuse (Babyatsky et Podolsky, 1999).

1.2 La membrane basilaire

L'épithélium du côlon ainsi que tous les épithéliums interagissent avec une mince couche de glycoprotéines retrouvées à l'interface de l'épithélium et la lamina propria, appelée la membrane basilaire. Elle est formée d'une lame basale composée des glycoprotéines sécrétées par les cellules épithéliales et d'une lame réticulaire contenant les glycoprotéines sécrétées par les cellules du tissu conjonctif sous-adjacent (Simon-Assmann *et al.*, 1990). La membrane basilaire est notamment constituée d'un réseau organisé de laminines (Teller *et al.*, 2007), de protéoglycans (Beaulieu, 1997), de collagènes (Groulx *et al.*, 2011) et de fibronectines (Gagné *et al.*, 2010). Les cellules épithéliales interagissent avec la membrane basilaire par les différents récepteurs exprimés à leur surface basolatérale, tels que les intégrines (Lussier *et al.*, 2000). De par les interactions entre les composantes de la membrane basilaire et les différents récepteurs basolatéraux exprimés par les cellules épithéliales, la membrane basilaire contribue à la régulation des fonctions physiologiques des cellules épithéliales telles que le métabolisme, la prolifération, la survie et la différenciation (Beaulieu, 1997; Benoit *et al.*, 2012; Groulx *et al.*, 2011; Lussier *et al.*, 2000; Teller et Beaulieu, 2001). En plus de son rôle fonctionnel, la membrane basilaire fournit également un support structurel physique à l'épithélium tout en formant une barrière entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent (LeBleu *et al.*, 2007). Par conséquent, la membrane basilaire agit comme un filtre pour permettre aux petites molécules du sang de la traverser pour aller vers les cellules épithéliales et aux nutriments absorbés de rejoindre la circulation sanguine (Timpl, 1996). Elle empêche également l'invasion des cellules épithéliales dans le tissu conjonctif et sert de support à la migration de ces dernières lors de la cicatrisation d'une blessure (Seltana *et al.*, 2010).

1.3 L'épithélium du côlon

Contrairement à l'épithélium villositaire retrouvé dans l'intestin grêle, le côlon est constitué de multiples glandes de Lieberkuhn et d'un épithélium de surface plat. Ses principales fonctions sont la récupération de l'eau, l'absorption de certains sels minéraux et vitamines, telle que la vitamine K, et de fournir un emplacement pour la fermentation de la flore

bactérienne (Babyatsky et Podolsky, 1999). De plus, par les jonctions serrées entre les cellules, l'épithélium colique sert de barrière physique sélective entre le contenu de la lumière et l'organisme. (Turner, 2009). Cette barrière permet le transport et l'absorption des nutriments par la circulation sanguine tout en empêchant la translocation de pathogènes bactérienne, des toxines intraluminales et des antigènes étrangers. L'épithélium colique constitue également est une barrière chimique contre les bactéries pathogènes par la sécrétion de différents facteurs antimicrobiens tels que les mucines, les défensines et les cytokines. L'épithélium de la glande colique est une unité fonctionnelle dynamique formée de deux compartiments distincts (Figure 1). La région du tiers inférieur de la glande constitue le compartiment des cellules progénitrices prolifératives non différenciées et des cellules souches. Le deux tiers supérieurs et la surface de la glande correspondent au compartiment des cellules différenciées et quiescentes composées majoritairement des cellules absorbantes (entérocytes) et des cellules à mucus (cellules caliciformes) (Ménard *et al.*, 2006). Chez l'humain, l'épithélium de la glande colique est renouvelé en environ cinq jours (Babyatsky et Podolsky, 1999). Le renouvellement constant et rapide de l'épithélium est assuré par les cellules souches résidentes du fond de la glande qui engendreront les cellules filles progénitrices, lesquelles entameront un processus de différenciation et migreront le long de la glande pour remplacer les cellules différenciées éliminées par apoptose/anoïkose. Par conséquent, la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose/anoïkose doivent être parfaitement coordonnées pour assurer l'homéostasie de l'épithélium colique. Cette coordination est finement régulée par les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines, les interactions intercellulaires et les interactions des cellules avec la membrane basilaire (Babyatsky et Podolsky, 1999; Ménard *et al.*, 2006). Il arrive parfois que lors du processus de renouvellement de l'épithélium, les cellules souches de l'épithélium du côlon et du rectum soient le siège de proliférations anormales et non contrôlées entraînant la formation de polypes (adénomes), pouvant mener à un cancer colorectal invasif (Gryfe *et al.*, 1997).

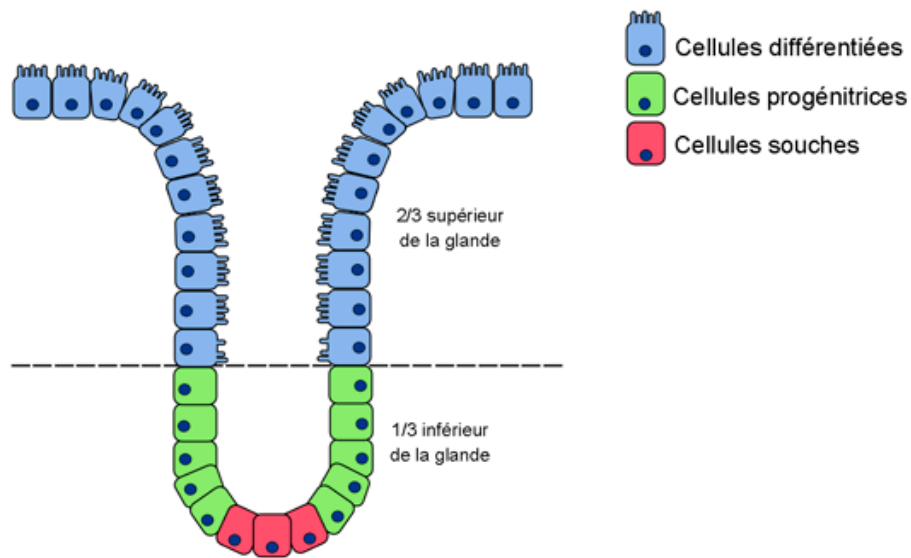


Figure 1 : Représentation d'une structure glandulaire de l'épithélium de la glande colique. L'épithélium du côlon est formé d'un épithélium simple glandulaire, dont les invaginations ou cryptes représentent les glandes de Lieberkühn. L'unité fonctionnelle de la glande est divisée en deux compartiments distincts. Le tiers inférieur de la glande correspond au compartiment des cellules souches ainsi que leurs cellules progénitrices à division rapide. Le deux tiers supérieurs et la surface de la glande correspondent au compartiment des cellules différenciées. Le renouvellement complet de l'épithélium de la glande est assuré par les cellules souches du fond de la glande, par l'intermédiaire des cellules progénitrices qui vont rapidement proliférer pour ensuite migrer vers le haut de la glande et entamer un processus de différenciation. Adapté de (Groulx *et al.*, 2012).

1.4 Le cancer colorectal

Le cancer colorectal est la troisième forme de cancer la plus courante et la deuxième cause de décès par cancer au Canada (Statistique Canada, 2013). Dans la majorité des cas, le cancer colorectal provient d'une accumulation successive d'altérations génétiques et épigénétiques dans la cellule épithéliale telles que les mutations et l'hyperméthylation de l'ADN (Rowley, 2005). La plupart des mutations retrouvées dans le cancer colorectal sont sporadiques (80 %) (Rustgi, 2007). Toutefois, il existe des mutations héréditaires prédisposant une personne à développer un cancer colorectal, soit dans le gène adenomatous polyposis coli (*APC*), causant le syndrome de polypose adénomateuse familiale (PAF) (Cottrell *et al.*, 1992) ou dans les gènes responsables de la réparation de l'ADN, causant le syndrome de Lynch ou le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) (Fishel *et al.*, 1993). L'accès aux tissus de cancers colorectaux provenant de patients a permis d'identifier les principales mutations et séquences d'évènements impliqués dans la carcinogenèse colorectale, appelé modèle de la carcinogenèse colorectal de Fearon et Vogelstein (Fearon et Vogelstein, 1990). Une dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine, causée soit par une mutation dans le gène *APC* ou une mutation dans le gène *CTNNB1*, a été identifiée comme l'un des évènements initiaux de la carcinogenèse colorectale. Cette dérégulation entraîne la prolifération non contrôlée des cellules épithéliales intestinales, causant la formation d'un adénome bénin, couramment appelé polype (Powell *et al.*, 1992). Les polypes ne sont pas toujours précurseurs d'un cancer colorectal, mais l'adénocarcinome colique fait presque toujours suite à des polypes. L'accumulation successive de mutations dans les gènes de la GTPase *KRAS* et de la kinase *BRAF* (Davies *et al.*, 2002), dans les gènes de *P53* (Cho et Vogelstein, 1992) et du *TGF- β* (Gryfe *et al.*, 1997), combinées à l'augmentation de la méthylation de l'ADN (Lengauer *et al.*, 1997) et l'instabilité génomique (Lengauer *et al.*, 1998) vont mener graduellement au développement de l'adénocarcinome colorectal. D'autres évènements entraînent par la suite la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme par le système sanguin et lymphatique, menant à la formation de métastases dans les ganglions et vers d'autres organes tels que le foie et les poumons (de Krijger *et al.*, 2011; Fearon, 1995; Markowitz et Bertagnolli, 2009). Outre les principaux évènements établis par le modèle Fearon et Vogelstein, plusieurs autres sont impliqués à diverses étapes de la carcinogenèse

colorectale incluant des mutations dans le gène *PTEN* (Guanti *et al.*, 2000), une surexpression de l'oncogène *MYC* (Rochlitz *et al.*, 1996) et l'acétylation des histones (Minchin *et al.*, 1993). Selon sa progression et sa dissémination dans l'organisme, le cancer colorectal est classé en différents stades. Le stade 0 correspond à un adénome bénin localisé dans la muqueuse intestinale. Les stades 1 et 2 représentent des adénocarcinomes avec des niveaux différents d'invasion de la paroi du côlon/rectum. Les stades 3 et 4 correspondent à un adénocarcinome dont les cellules cancéreuses sont disséminées dans l'organisme. Dans le stade 3, les cellules cancéreuses sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques avoisinant la tumeur alors que dans le stade 4, elles sont retrouvées dans d'autres organes tels que le foie et les poumons (Markowitz et Bertagnolli, 2009). En plus de la classification par stade, le cancer colorectal peut être stratifié selon le grade de la tumeur, basé sur l'analyse histologique du degré de différenciation et le comportement des cellules cancéreuses (Ueno *et al.*, 2012). Le grade 1 correspond à un adénocarcinome avec des cellules cancéreuses bien différenciées ressemblant beaucoup à des cellules normales, qui ont tendance à se développer lentement. Au grade 2, l'adénocarcinome contient des cellules cancéreuses moyennement différenciées, proliférant plus rapidement, tandis qu'aux grades 3 et 4, les cellules tumorales sont non différenciées et ont tendance à croître beaucoup plus rapidement (Ueno *et al.*, 2012).

1.5 La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt contrôle plusieurs fonctions cellulaires importantes telles que la prolifération, la polarité et la migration des cellules ainsi que l'embryogenèse et le développement (Logan et Nusse, 2004). Les protéines WNT forment une famille de glycoprotéines sécrétées liant les récepteurs transmembranaires FRIZZLED pour activer deux types de voie de signalisation distincte : la voie canonique et la voie non canonique (Angers et Moon, 2009). La voie non canonique opère de façon β -caténine indépendante et régule la polarité cellulaire et la voie du Ca^{2+} . Pour ce qui est de la voie canonique, appelée la voie Wnt/ β -caténine, elle régule la stabilisation de β -caténine sous forme non phosphorylée et conséquemment la prolifération cellulaire (Klaus et W. Birchmeier, 2008). La voie canonique, la mieux caractérisée, est fortement impliquée dans la tumorigenèse. Lorsque la voie canonique est inactive en l'absence de ligands WNT, la β -caténine non intégrée dans

les jonctions entre les cellules s'associe au complexe de destruction formé de la protéine d'échafaudage AXIN, de la protéine APC et des kinases CK1 α et GSK3 β . La β -caténine est alors phosphorylée par la CK1 α et la GSK3 β pour être ensuite ubiquitinée et dégradée par le protéasome. En l'absence de la β -caténine au noyau, les facteurs TCF4/LEF1 s'associent au facteur Groucho sur les promoteurs des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine pour réprimer leur transcription (Figure 2). La liaison des facteurs WNT sur le complexe formé du récepteur FRIZZLED et de son corécepteur LRP-5/6 entraîne le recrutement et l'activation de la phosphoprotéine dishevelled (DVL) à la membrane plasmique. Chez l'humain, il existe trois membres de la famille des protéines dishevelled possédant des fonctions redondantes, soit DVL1, DVL2 et DVL3 (Wallingford et Habas, 2005). Une fois la protéine DVL recrutée à la membrane, elle inhibe le complexe de destruction APC/AXIN/CK1 α /GSK3 β provoquant la stabilisation de la β -caténine et sa translocation au noyau. Par la suite, la β -caténine remplace Groucho et s'associe avec les facteurs TFC4/LEF1 dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles (Figure 2) (Kimelman et Xu, 2006). L'activation de la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans le développement de l'intestin, l'homéostasie des cellules souches intestinales adultes et également dans le cancer colorectal (Schuijers et Clevers, 2012; van der Flier et Clevers, 2009). Plus spécifiquement, elle est reconnue comme la force dominante pour l'activation de la prolifération de l'épithélium intestinal à la fois dans son état physiologique et dans le cancer colorectal. Ainsi, 90 % des cas de cancer colorectal humain arborent une mutation dans l'un des facteurs clés de la régulation de la voie Wnt/ β -caténine, le plus souvent dans les gènes *APC*, *CTNNB1* et *AXIN2* (Sparks *et al.*, 1998). Ces mutations affectent la stabilité de la β -caténine, et sont retrouvées mutuellement exclusives dans les tumeurs (Sparks *et al.*, 1998). Toutefois, la voie Wnt/ β -caténine est aussi régulée et hyperactivée dans le cancer par plusieurs voies de signalisation, des molécules extracellulaires et intracellulaires et des modifications épigénétiques (Suzuki *et al.*, 2004; Polakis, 2012). Par exemple, l'autophagie peut dégrader la protéine DVL (Gao *et al.*, 2010), alors que l'activation des voies de signalisation AKT/PI3K et MAPK inhibe la GSK3 β entraînant l'augmentation de la forme stable et non phosphorylée de la β -caténine (Segditsas et Tomlinson, 2006). De plus, le micro-ARN mir135, dont l'expression est augmenté dans le cancer colorectal,

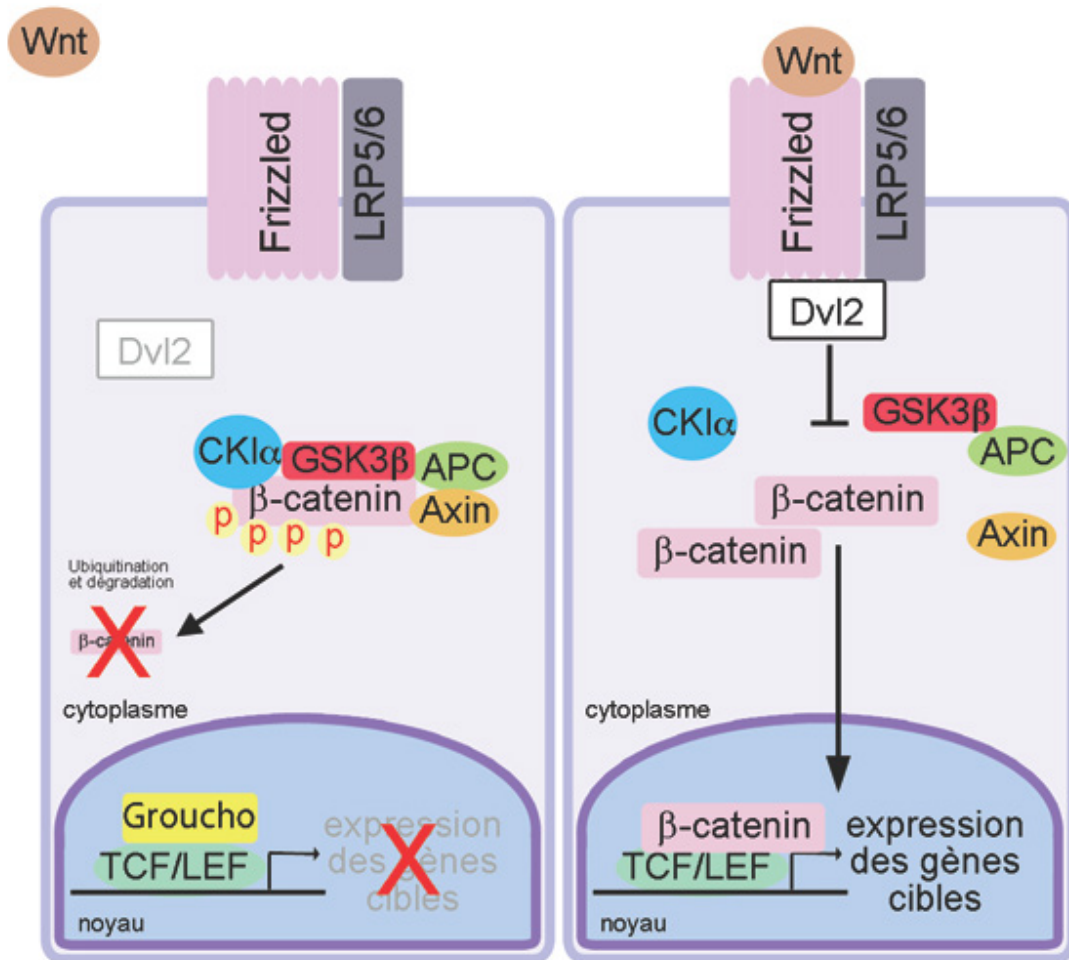


Figure 2 : La voie Wnt/β-caténine. Lorsque la voie n'est pas stimulée par les facteurs WNT solubles, la β-caténine est phosphorylée par le complexe de destruction composé de l'Axin, APC, GSK3β et CK1α, entraînant l'ubiquitination et la dégradation de la β-caténine. Dans le noyau, le complexe TCF4/LEF1 s'associe alors à Groucho pour réprimer les gènes cibles. La liaison des facteurs WNT sur le complexe formé du récepteur FRIZZLED et du corécepteur LRP5/6 entraîne le recrutement de la protéine DVL à la membrane plasmique. Une fois à la membrane, DVL inhibe le complexe de destruction, libérant la β-caténine. Celle-ci s'accumule au noyau et s'associe aux cofacteurs TCF4/LEF1 pour activer l'expression des gènes cibles. Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

entraîne la dégradation de l'ARN messager du gène *APC* (Nagel *et al.*, 2008). C'est donc par l'intermédiaire de l'accumulation synergique des mutations des gènes *APC/CTNNB1* et de la dérégulation d'autres éléments que l'activation de voie Wnt/ β -caténine influencera la prolifération cellulaire et la progression du cancer colorectal.

1.6 Le proto-oncogène *MYC*

Le proto-oncogène *MYC* fait partie d'une famille de gènes codant pour des facteurs de transcription comprenant *N-MYC* et *L-MYC*. La protéine MYC exerce la majorité de ses fonctions par l'association de son domaine leucine zipper (LZ) avec une autre protéine B-HLH-LZ, appelée MAX (Grandori *et al.*, 2000). Comme hétérodimère avec MAX, MYC lie la séquence CACGTG sur la région activatrice (E-box) du promoteur via son domaine B-HLH. Le complexe protéique MYC/MAX recrute alors le complexe SWI/SNF entraînant la modification des histones et l'ouverture de la chromatine pour permettre l'activation de la transcription des gènes cibles favorisant la tumorigenèse (Dang *et al.*, 2006) (Figure 3A). Cependant, la protéine MAD peut agir en compétition avec MYC pour son hétérodimérisation avec MAX, réprimant ainsi les gènes cibles protumoraux (Figure 3B). Lorsque MAX se lie à MAD, l'hétérodimère MAD/MAX lie la même séquence reconnue par MYC/MAX dans la région activatrice et recrute le complexe corépresseur de la chromatine composé des protéines SIN3, NCOR1 et des histones désacétylases HDAC1/2. Le complexe permet la désacétylation des queues des histones et un remodelage de la chromatine, empêchant l'accès des facteurs de transcription au promoteur des gènes cibles (Eilers et Eisenman, 2008; Grandori *et al.*, 2000). Toutefois, l'hétérodimère MYC/MAX peut aussi réprimer l'expression de gènes par son association avec la protéine MIZ-1. Lorsque MYC est absent, MIZ-1 active l'expression des gènes cibles par le recrutement du complexe P300/NPM. Cependant, lorsque couplé à MIZ-1, le complexe MYC/MAX déplace le complexe P300/NPM et réprime la transcription des gènes cibles antiprolifératifs comme *CDKN2B*, *CDKN1A*, *CDKN1C* et *P53* pour favoriser la tumorigenèse (Figure 3B) (Wiese *et al.*, 2013). Ensemble, MYC et ses partenaires régulent l'expression d'environ 15 % des gènes chez l'humain, contrôlant ainsi d'importants processus physiologiques impliqués dans la carcinogenèse tels que la transformation, l'apoptose, la prolifération, l'instabilité génomique, le métabolisme, les dommages à l'ADN, la différenciation et

l'angiogenèse (Dang *et al.*, 2006; Eilers et Eisenman, 2008). Par ailleurs, MYC régule aussi l'épissage alternatif de gènes protumoraux. En effet, une étude a démontré que le facteur d'épissage alternatif SRSF1 est une cible de MYC et qu'il contribue à son potentiel oncogène en favorisant l'expression des isoformes spécifiques de la kinase MKNK2 et du facteur de transcription TEAD1 (Das *et al.*, 2012). De plus, MYC régule l'expression des facteurs d'épissage HNRNPH (Rauch *et al.*, 2011), HNRNPA2B1 et PTB1 (David *et al.*, 2010) pour favoriser l'expression d'un variant oncogénique de la pyruvate kinase et de la sérine/thréonine kinase A-Raf. Dans le cancer colorectal, le gène *MYC* est amplifié ou surexprimé dans 10 % et 70 % des cas respectivement (Rochlitz *et al.*, 1996). Différents facteurs entraînent la surexpression de MYC dans le cancer. Par exemple, le promoteur du gène *MYC* est activé par des facteurs de transcription tels que ETS1 et E2F1 en réponse aux signaux de facteurs de croissance (Roussel *et al.*, 1994) et par le complexe β -caténine/TCF4 en réponse à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (He *et al.*, 1998). De plus, MYC peut être régulé de façon post-transcriptionnelle par les micro-ARN miR-34b/c régulant la stabilité de son ARN messager (Kress *et al.*, 2011), ou via sa phosphorylation par les kinases ERK et GSK3 β conduisant à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome (Yeh *et al.*, 2004). L'activité de transcription de MYC est également régulée négativement par le suppresseur de tumeur BIN-1 (Elliott *et al.*, 1999).

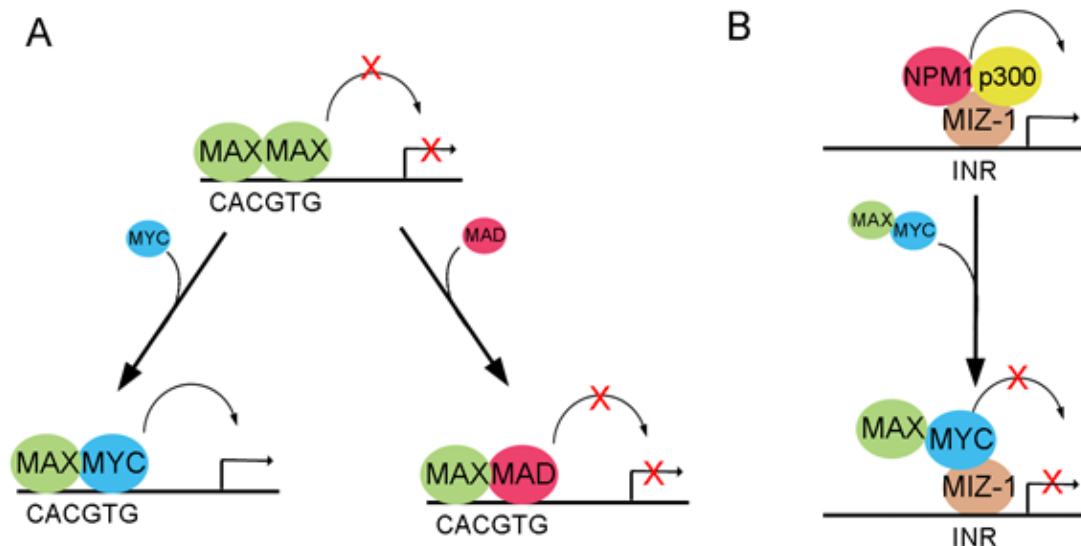


Figure 3 : Le réseau de MAX/MYC/MAD et MIZ-1. (A) La fonction de la protéine codée par le proto-oncogène *MYC* est modulée par la disponibilité de son partenaire de liaison hétérodimère MAX. Lorsque MYC est présent, il forme un hétérodimère avec MAX capable de lier l'ADN sur la séquence CACGTG au niveau de la région activatrice des promoteurs des gènes cibles. L'homodimère MAD/MAD entre en compétition avec MYC/MAD pour la liaison de cette séquence de l'ADN. MAX peut également former un hétérodimère avec le facteur de transcription MAD. MYC et MAD sont en compétition pour la liaison à MAX pour activer ou réprimer l'expression des gènes. Alors que l'hétérodimère MYC/MAX stimule la transcription par le recrutement d'un complexe protéique associé avec des histones acétylases modifiant la chromatine, l'hétérodimère MAD/MAX réprime la transcription, en partie par le recrutement d'un complexe corépresseur comprenant Sin3, N-CoR et des histones désacétylases (HDAC). (B) L'hétérodimère MYC/MAD peut avoir un effet répresseur sur certains gènes cibles. Le facteur MIZ-1 lie l'ADN sur la région INR du promoteur, recrute les protéines NPM1 et p300 pour activer la transcription du gène cible. Lorsque l'hétérodimère MYC/MAX est présent, il lie MIZ-1 et empêche le recrutement de NMP1/P300, réprimant ainsi la transcription du gène cible.

1.7 L'épissage alternatif

Le génome humain contient environ 32 000 gènes (Lander *et al.*, 2001). Cependant, le nombre de protéines distinctes retrouvées est d'environ 100 000, contredisant le dogme qu'un gène produit une protéine (Pal *et al.*, 2012). Cette diversité de protéines est principalement causée par l'épissage alternatif de l'ARN prémessager. L'ARN prémessager est composé de séquences codantes et non codantes appelées respectivement exons et introns. Lors de la formation de l'ARN messenger mature, les introns seront enlevés et les exons assemblés par l'épissage. Cependant, lors de la fusion des exons, certains seront inclus ou exclus de l'ARN messenger mature par l'épissage alternatif, produisant des isoformes protéiques distinctes aux fonctions biologiques uniques, et ce, à partir d'un seul gène. Chez l'humain, environ 95 % des gènes multi-exoniques subissent un épissage alternatif, augmentant considérablement la diversité protéique (Pan *et al.*, 2008). L'épissage alternatif se réalise par l'intermédiaire du spliceosome, un complexe ribonucléoprotéique nucléaire liant des séquences spécifiques à l'extrémité des exons (Black, 2003). Toutefois, l'inclusion ou l'exclusion d'un exon est régulée par l'intermédiaire de facteurs d'épissage alternatif transrégulateurs liant des séquences cisrégulatrices sur les ARN prémessagers. Il existe des facteurs d'épissage alternatif activateurs et répresseurs. Les facteurs activateurs, comprenant entre autres les protéines de la famille des SR (Serine-Arginine rich), favorisent l'utilisation de sites d'épissage particuliers, tandis que les facteurs répresseurs tels que les protéines de la famille des protéines HNRNP répriment l'utilisation de ces sites. La décision définitive d'inclure ou d'exclure un exon est déterminée par le ratio stœchiométrique, les interactions entre les facteurs activateurs et répresseurs de l'épissage et l'accessibilité des sites d'épissage (Matlin *et al.*, 2005). Ce processus est connu pour être impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques comprenant le cancer (Bonomi *et al.*, 2013; David et Manley, 2010; Liu et Cheng, 2013). Par exemple, l'épissage alternatif dans le cancer mène à la formation de variants protéiques possédant des fonctions protumorales, tels que la pyruvate kinase M2 favorisant le métabolisme cellulaire (David *et al.*, 2010), la cycline D1b régulant la prolifération cellulaire (Lu *et al.*, 2003) et la molécule d'adhésion CD44 (v4-v7) augmentant la capacité d'invasion et la formation de métastases (Yae *et al.*, 2012). De plus, une étude a récemment

démonstré que les facteurs d'épissage ESRP1/ESRP2 sont responsables de la transition épithéliale-mésenchyme par la régulation de l'expression de nombreux variants d'épissage (Warzecha *et al.*, 2010). Toutes ces études mettent en lumière le rôle important de l'épissage alternatif dans la carcinogenèse.

1.8 Les intégrines

Les intégrines sont les principaux récepteurs transmembranaires de type II responsables des interactions cellules-MEC. Elles sont formées de l'association non covalente d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Jusqu'à présent, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées chez l'humain, pour un total de 24 hétérodimères d'intégrines possibles possédant des rôles spécifiques (Figure 4) (Hynes, 1992). Toutefois, l'existence de plusieurs variants d'épissage et de modifications post-traductionnelles chez la plupart des sous-unités ce qui augmente considérablement la variété d'intégrines retrouvées chez l'humain (de Melker et Sonnenberg, 1999). Les intégrines sont classées en différentes sous-familles selon leurs fonctions cellulaires et leurs ligands extracellulaires. Il existe la sous-famille des intégrines interagissant avec la fibronectine et la vitronectine via une séquence conservée RGD, la sous-famille d'intégrines s'associant avec les laminines, la sous-famille des intégrines liant les collagènes et finalement celle des intégrines exprimées par les cellules leucocytaires (Figure 4) (Margadant *et al.*, 2011). Chaque sous-unité intégrine est constituée d'un large domaine extracellulaire d'environ 1000 acides aminés pour les sous-unités α et de 700 acides aminés pour les sous-unités β , d'une région transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique d'environ 75 acides aminés, à l'exception du domaine cytoplasmique de la sous-unité β_4 de 1000 acides aminés (Takada *et al.*, 2007). Les domaines N-terminaux des sous-unités α et β s'associent pour former l'extrémité extracellulaire de l'intégrine contenant le site de liaison du ligand, tandis que les domaines C-terminaux cytoplasmiques traversent la membrane plasmique et permettent l'interaction avec le cytosquelette et les protéines de signalisation intracellulaire. L'association des sous-unités α et β est régulée par des cations divalents, comme le Mg^{2+} et le Ca^{2+} (Giancotti, 2003).

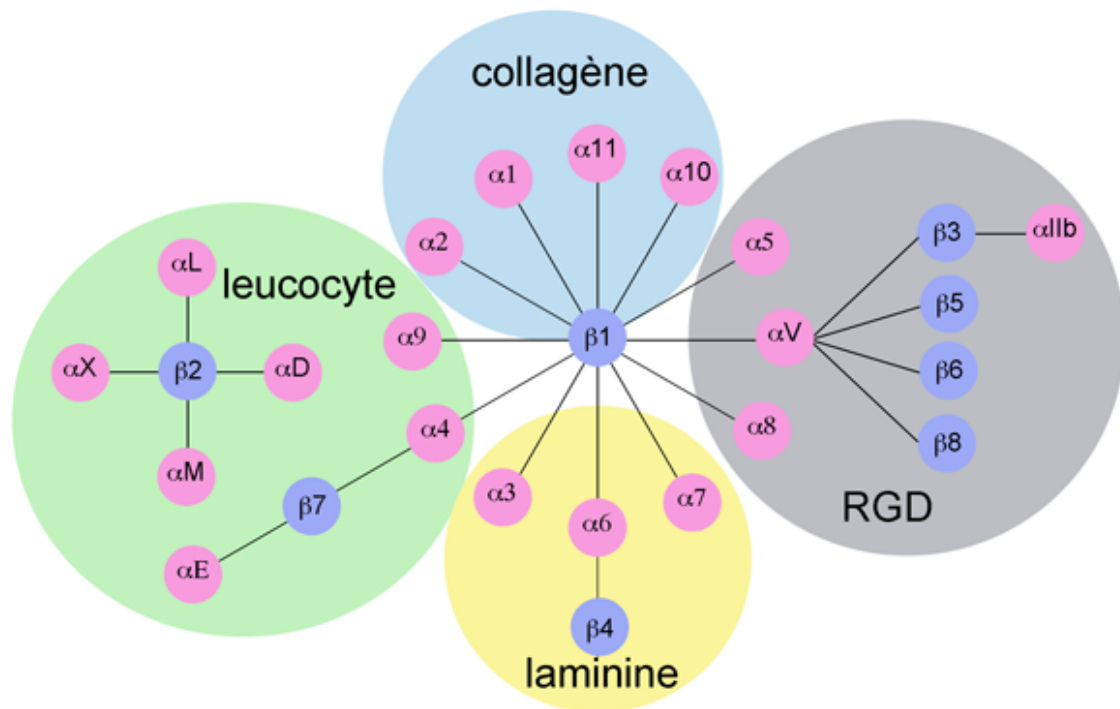


Figure 4 : La famille des récepteurs intégrines. La famille des récepteurs intégrines représente une superfamille de glycoprotéines transmembranaires formées d'une association hétérodimérique non covalente entre une sous-unité intégrine α et une sous-unité intégrine β . Il existe 18 sous-unités α (rose) et 9 sous-unités β (bleue) pour un total de 24 types d'intégrines possible chez l'humain. Les intégrines sont divisées en 4 sous-familles selon leur fonction et leur ligand extracellulaire, soit les intégrines spécifiques au leucocyte (cercle vert), les intégrines liant les laminines (cercle jaune), les intégrines liant les collagènes (cercle bleu) et les intégrines liant le motif RGD retrouvé dans fibronectine, vitronectine et la néphronectine (cercle gris).

Les intégrines assurent la connexion transmembranaire entre les éléments de la MEC, le cytoplasme de la cellule et le cytosquelette d'actine pour réguler les signaux modulant les fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la migration, la prolifération, la survie ou l'apoptose, la polarité, la migration, la différenciation, l'invasion et l'expression de gènes (Clark et Brugge, 1995; Giancotti, 2003). Contrairement aux récepteurs de facteurs de croissance, les intégrines ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque (de Melker et Sonnenberg, 1999). Leur activation par la liaison aux protéines de la MEC induit un changement de conformation du domaine cytoplasmique C-terminal permettant le recrutement de protéines adaptatrices et kinases pour la transmission des signaux et pour influencer les diverses fonctions cellulaires. En dehors d'un contexte pathologique tel que le cancer, la plupart des intégrines existent dans différentes conformations d'affinité et sont souvent exprimées à la membrane plasmique sous une forme inactive, ne pouvant pas lier leur ligand et n'engendrant aucune signalisation. L'affinité et l'activation des intégrines sont régulées par des événements cytoplasmiques (signalisation de l'intérieur vers l'extérieur) ou par des facteurs extracellulaires (signalisation de l'extérieur vers l'intérieur) (Figure 5). Au niveau cytoplasmique, les intégrines sont activées par la liaison de la taline au domaine cytoplasmique de la sous-unité β ou encore par les voies de signalisation MAPK et PIP3/AKT qui phosphorylent le domaine cytoplasmique de la sous-unité β . Ces événements induisent la séparation des domaines cytoplasmiques des deux sous-unités, engendrant un changement de conformation du domaine extracellulaire pour permettre la reconnaissance et la liaison à leur ligand de la MEC (Figure 5) (Hynes, 1992). Dans le cas de l'activation par les facteurs extracellulaires, la liaison du ligand au domaine extracellulaire des intégrines provoque l'association en groupe des intégrines dans la membrane plasmique, induisant un changement de conformation des domaines cytoplasmiques des deux sous-unités. Ce changement permet le recrutement de protéines adaptatrices telles que la paxiline et la vinculine et de kinases telles que FAK et SRC sur les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β (Figure 5). Par l'intermédiaire de ces protéines, la plupart des intégrines vont s'associer avec le cytosquelette d'actine pour former une gamme de structures d'adhésion telles que les complexes focaux, les adhésions focales, les adhérences fibrillaires, les podosomes et les invadopodes (Geiger et Yamada, 2011). En revanche, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est la seule à s'associer au système de filament

intermédiaire, et à se localiser dans l'hémidesmosome (Margadant *et al.*, 2008). À partir de ces structures d'adhésion, le signal extracellulaire est transmis vers l'intérieur de la cellule pour réguler ses fonctions.

Dans l'épithélium intestinal, les intégrines sont exprimées différemment selon les compartiments de la glande et leurs interactions avec la MEC sont cruciales dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal normal (Beaulieu, 2010; Beaulieu *et al.*, 1999; Beaulieu *et al.*, 1997; Lussier *et al.*, 2000). Outre leurs rôles physiologiques, plusieurs évidences démontrent l'importance des intégrines et de leurs interactions à différentes étapes de la progression du cancer colorectal, en tant que principaux modulateurs de la survie cellulaire, l'invasion, la migration et la prolifération (Guo et Giancotti, 2004). Par exemple, l'expression de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ sensibilise les cellules de cancer colorectal à l'anoïkose (Benoit *et al.*, 2010), tandis que la suppression de l'intégrine $\alpha V \beta 6$ inhibe la dégradation de la MEC et l'invasion via la voie de signalisation MAPK (J. Wang *et al.*, 2008). De plus, la sous-unité $\beta 1$ est un important médiateur de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses colorectales (Zhao *et al.*, 2014). Les intégrines sont rarement retrouvées mutées dans le cancer colorectal (Guo et Giancotti, 2004). Leurs dérégulations proviennent pour la plupart d'un changement dans leur expression, comme c'est le cas des intégrines $\alpha 1 \beta 1$ (Boudjadi *et al.*, 2013), $\alpha 9 \beta 1$ (Basora *et al.*, 1998) et $\alpha 6 \beta 4$ (Dydenborg *et al.*, 2009b; Ni *et al.*, 2005) qui sont retrouvées surexprimées dans les tumeurs colorectales humaines.

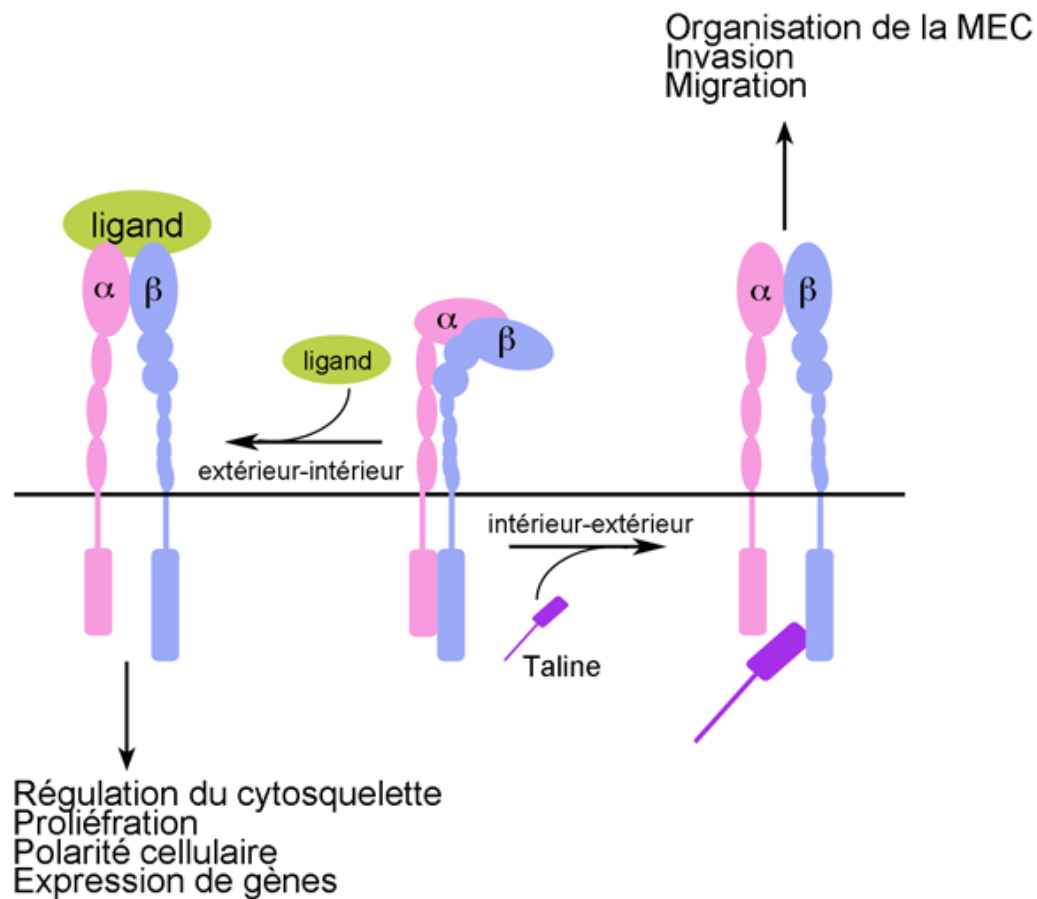


Figure 5 : Modèle d'activation et de signalisation des intégrines. La majorité des intégrines est exprimée à la membrane plasmique sous une forme inactive, repliée sur elle-même. Les intégrines peuvent être activées par des événements cytoplasmiques (signalisation de l'intérieur vers l'extérieur). La taline peut lier le domaine cytoplasmique des sous-unités β provoquant un changement de conformation du domaine extracellulaire et permettant la liaison du ligand. Cette signalisation intérieur-extérieur permet de réguler l'affinité ligand-intégrine et ainsi affecte l'organisation de la MEC, l'invasion et la migration. D'un autre côté, les intégrines peuvent être aussi activées par la liaison des ligands extracellulaires (signalisation de l'extérieur vers l'intérieur). La liaison des ligands aux domaines extracellulaires des deux sous-unités entraîne un changement de conformation des domaines cytoplasmiques des deux sous-unités. Ce changement permet le recrutement de protéines kinases et adaptatrices régulant différentes voies de signalisation modulant l'organisation du cytosquelette, la prolifération, la polarité cellulaire et l'expression de gènes.

1.9 L'intégrine $\alpha 6\beta 4$

La sous-unité intégrine $\alpha 6$ peut former des hétérodimères avec les sous-unités intégrines $\beta 1$ et $\beta 4$ pour former les intégrines $\alpha 6\beta 1$ ou $\alpha 6\beta 4$. Toutefois, dans l'épithélium intestinal et le cancer colorectal, la sous-unité intégrine $\alpha 6$ s'associe principalement avec la sous-unité $\beta 4$ pour former l'intégrine majoritaire $\alpha 6\beta 4$ (Basora *et al.*, 1999). L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ exprimée à la base de la plupart des cellules épithéliales s'attache avec toutes les laminines retrouvées dans la MEC (Lee *et al.*, 1992). Le domaine cytoplasmique de $\beta 4$ interagit avec le réseau de kératine par l'intermédiaire de la plectine pour initier la formation d'hémidesmosomes, un complexe d'adhésion spécialisé attachant les cellules épithéliales à la laminine $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ de la membrane basilaire (Borradori et Sonnenberg, 1999). L'hémidesmosome est une structure dynamique formée des composantes transmembranaires telles que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, CD151, BP180 et des composantes cytoplasmiques telles que la plectine et la protéine BP230. Cette structure d'adhésion peut être rapidement désassemblée dans des circonstances particulières telles que la division cellulaire ou la migration (Borradori et Sonnenberg, 1996; Sterk *et al.*, 2000). Il existe deux types d'hémidesmosomes qui se distinguent par leur maturité et leurs composantes protéiques. L'épithélium stratifié tel que celui de la peau exprime des hémidesmosomes matures formés de toutes les composantes transmembranaires et cytoplasmiques, appelés hémidesmosomes de type I (Green et Jones, 1996). Toutefois, l'épithélium intestinal simple exprime des hémidesmosomes immatures dépourvus des protéines BP180/BP230, appelés hémidesmosomes de type II (Fontao *et al.*, 1999). L'hémidesmosome de type II présent dans l'intestin est plus dynamique que l'hémidesmosome de type I mature, permettant la migration des cellules épithéliales intestinales le long de la villosité intestinale des glandes coliques de Liberkuhn (Mercurio *et al.*, 2001). L'abolition de l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ inhibe la formation de l'hémidesmosome. Conséquemment, le rôle principal de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est de maintenir l'intégrité structurale de l'épithélium glandulaire intestinal (Dowling *et al.*, 1996).

1.10 La signalisation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans le cancer

En plus de son rôle structural, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ peut également engendrer une signalisation intracellulaire et contrôler différents processus physiologiques. L'activation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ provoque la phosphorylation du domaine cytoplasmique de $\beta 4$ par les kinases de la famille de SRC pour le recrutement de SHC/GRB2 (Dans *et al.*, 2001), IRS1/IRS-2 (Shaw, 2001) menant à l'activation des voies de signalisation MERK/ERK (Yoon *et al.*, 2006) et PI3K/AKT (Rabinovitz et Mercurio, 1996). La signalisation émergeant de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ influence les processus cellulaires impliqués dans la cancérogenèse tels que la migration et l'invasion via RAC1 (Rabinovitz et Mercurio, 1996) ainsi que l'apoptose via AKT et VEGF (Mercurio *et al.*, 2004). Plusieurs études ont établi que l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ peut initier une signalisation sans la liaison avec son ligand extracellulaire dans le cancer. Cela est causé par la proximité physique de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ avec les différents récepteurs tyrosine kinases et le fait que les deux types de récepteurs peuvent coopérer en synergie (Chao *et al.*, 1996). En effet, il a été prouvé que l'activation du récepteur RON engendre la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$, le déplacement de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ de l'hémidesmosome aux lamellipodes et l'activation de la voie NF-kappaB nécessaire pour la migration des kératinocytes (Santoro *et al.*, 2003). De plus, la sous-unité intégrine $\beta 4$ peut être également phosphorylée et sa signalisation activée par le récepteur EGF (Mainiero *et al.*, 1996) et le récepteur MET (Bertotti *et al.*, 2005). Les études sur l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ se sont principalement intéressées à la sous-unité $\beta 4$, mais plusieurs évidences suggèrent que la sous-unité $\alpha 6$ posséderait aussi un rôle important dans la fonction de signalisation de cette intégrine. L'abolition de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome inhibe leur auto-renouvellement ainsi que leur capacité à proliférer et à former des tumeurs (Lathia *et al.*, 2010). Par ailleurs, la sous-unité $\alpha 6$ régule le cycle cellulaire, la migration et l'invasion des cellules métastatiques du cancer du sein par une modulation des voies de signalisation CHK 1 et RB/E2F (Y. Wang *et al.*, 2011). Le rôle protumoral de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ est aussi supportée par le fait que des niveaux élevés de son expression dans le cancer du sein humain corrélerent avec une réduction de la survie (Friedrichs *et al.*, 1995).

1.11 Les variants de la sous-unité intégrine $\beta 4$

La sous-unité $\beta 4$ est très atypique par rapport aux autres sous-unités. Elle possède un très long domaine cytoplasmique de 1000 acides aminés formé de deux répétitions de type fibronectine III séparées par un segment connecteur. Il existe 5 variants de la sous-unité $\beta 4$ (A, B, C, D, E), mais la sous-unité $\beta 4A$ est la principale forme de la sous-unité $\beta 4$ exprimée dans l'intestin (Basora *et al.*, 1999; de Melker et Sonnenberg, 1999; Ni *et al.*, 2005). La sous-unité $\beta 4A$ peut également subir un clivage protéolytique de son domaine C-terminal, appelé $\beta 4cdt^-$, le rendant non fonctionnel pour l'adhésion sur la laminine comparativement à la forme non clivée, $\beta 4cdt^+$ (Basora *et al.*, 1999).

1.12 Les variants d'épissage alternatif $\alpha 6A/\alpha 6B$

La sous-unité $\alpha 6$ se retrouve en deux variants d'épissage alternatif, soit le variant $\alpha 6A$ et le variant $\alpha 6B$ caractérisés par des domaines cytoplasmiques distincts résultant de l'épissage alternatif d'un exon (Hogervorst *et al.*, 1991). Lors de l'épissage alternatif de l'ARN prémessager de la sous-unité intégrine $\alpha 6$, le domaine cytoplasmique est codé par les exons 24, 25 et 26. Cependant, l'exon 25 peut subir un épissage alternatif et être inclus ou exclu de l'ARN mature (de Melker et Sonnenberg, 1999). Son inclusion mène à la formation du variant $\alpha 6A$, tandis que son exclusion permet la formation du variant $\alpha 6B$. Ceci résulte en la formation d'un ARNm plus long pour le variant $\alpha 6A$. Toutefois, l'inclusion de l'exon 25 entraîne un changement du cadre de lecture et l'utilisation d'un codon stop différent selon le variant. Ainsi, lors de la translation, si l'exon 25 est exclus de l'ARNm, il aura utilisation d'un codon stop situé dans l'exon 26, tandis que l'inclusion de l'exon 25 occasionne un changement du cadre de lecture et l'introduction d'un codon-stop prématuré (Figure 6). L'introduction d'un codon-stop prématuré génère alors la formation d'un domaine cytoplasmique plus court de 18 acides aminés avec une séquence distincte comparativement au variant $\alpha 6B$, mise à part la présence du domaine GFFKR régulant son hétérodimérisation (Hogervorst *et al.*, 1993). Globalement, l'inclusion de l'exon 25 dans l'ARNm du variant $\alpha 6A$ engendre la formation d'une protéine de plus petit poids moléculaire, causé par l'utilisation d'un nouveau codon stop. Au niveau biochimique,

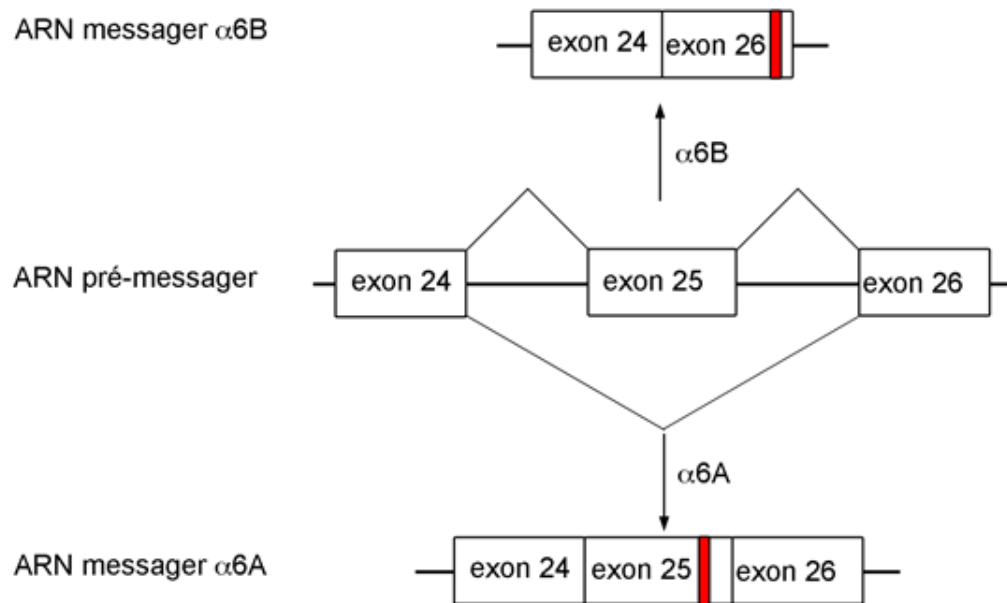


Figure 6 : Schéma de l'épissage alternatif de la sous-unité intégrine $\alpha 6$. L'ARN prémessager de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ codant pour le domaine cytoplasmique est formé de trois exons (exon 24, exon 25 et exon 26). L'épissage alternatif permet d'inclure ou d'exclure l'exon 25 de l'ARN messenger mature. Lorsque l'exon 25 est inclus, il y a formation du variant $\alpha 6A$, tandis que son exclusion résulte en la formation du variant $\alpha 6B$. L'inclusion de l'exon 25 provoque un changement du cadre de lecture et introduit un codon-stop prématuré. Le trait rouge indique la localisation du codon stop selon le variant d'épissage.

plusieurs évidences suggèrent des fonctions différentes des deux variants. Entre autres, la surexpression du $\alpha 6A$ et non du variant $\alpha 6B$ dans les macrophages exprimant la sous-unité $\beta 1$, augmente leur adhésion et leur migration lors de leur attachement sur la laminine (Shaw et Mercurio, 1994). Au niveau moléculaire, l'adhésion des macrophages P388D1 exprimant l'intégrine $\alpha 6A\beta 1$ sur la laminine EHS induit la phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine du cytosquelette paxiline et de deux autres protéines jusqu'ici inconnues de 110 kDa et 120 kDa, comparativement à l'intégrine $\alpha 6B\beta 1$ (Shaw *et al.*, 1995). De plus, l'expression de l'intégrine $\alpha 6A\beta 1$ et non de l'intégrine $\alpha 6B\beta 1$ dans deux lignées cellulaires épithéliales et dans les macrophages déclenche l'activation de la voie MAPK/ERK lors de l'adhésion sur la laminine (Ferletta *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 1998). Cette même activation préférentielle de la voie des MAPK/ERK par le variant $\alpha 6A$ est responsable de l'augmentation de leur capacité de migration sur la laminine (Wei *et al.*, 1998). Néanmoins, le rôle des intégrines $\alpha 6A\beta 4$ et $\alpha 6B\beta 4$ demeure encore peu connu étant donné que la majorité des études sur les variants d'épissage de la sous-unité $\alpha 6$ a été réalisée dans le contexte d'une hétérodimérisation avec la sous-unité $\beta 1$. En plus de leurs différences biochimiques, l'expression des deux variants dans l'organisme humain est différente selon le tissu (Hogervorst *et al.*, 1993). La glande mammaire, l'épiderme et les neurones périphériques expriment exclusivement le variant $\alpha 6A$, tandis que l'épithélium du rein exprime seulement le variant $\alpha 6B$. Cependant, certains organes expriment les deux variants, tel que l'épithélium intestinal (Hogervorst *et al.*, 1993).

1.13 L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans le côlon et le cancer colorectal

Au niveau de l'épithélium glandulaire, les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 4$ sont exprimées dans toutes les cellules épithéliales et leur expression est augmentée dans les échantillons pathologiques de cancer du côlon et les lignées d'adénocarcinome colorectal (Beaulieu, 2010). De plus, l'expression de la sous-unité $\beta 4$ corrèle fortement avec l'expression de l'oncogène *MYC* (Ni *et al.*, 2005). L'analyse des variants de clivage protéolytique de la sous-unité $\beta 4$ ($\beta 4cdt^-/\beta 4cdt^+$) a permis d'observer que la forme $\beta 4cdt^-$ est associée aux cellules prolifératives, tandis que la forme sauvage est principalement présente dans les cellules différenciées de la glande. Le cancer colorectal et les lignées cellulaires de cancer

colorectal Caco-2/15, HT29, T84, LoVo, Colo201 et HCT116 expriment exclusivement la forme sauvage ($\beta 4\text{cdt}^+$) (Ni *et al.*, 2005). Dans le cas de la sous-unité intégrine $\alpha 6$, des expériences d'immunolocalisation ont démontré que le variant $\alpha 6\text{A}$ est retrouvé au niveau des cellules prolifératives du tiers inférieur de la glande colique alors que le variant $\alpha 6\text{B}$ est prédominant dans les colonocytes quiescents et différenciés des deux tiers supérieurs de la glande et de l'épithélium de surface. Bien qu'aussi détectée dans le côlon normal, cette localisation réciproque des variants est perdue dans les tumeurs primaires, et le variant $\alpha 6\text{A}$ devient exprimé dans toutes les cellules de cancer colorectal (Dydenborg *et al.*, 2009b). Cette expression différentielle de tous les variants des sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 4$ dans le cancer colorectal entraîne la formation d'une nouvelle intégrine absente du côlon normal, soit l'intégrine formée des sous-unités $\alpha 6\text{A}$ et $\beta 4\text{cdt}^+$, l'intégrine $\alpha 6\text{A}\beta 4\text{cdt}^+$ (Beaulieu, 2010). Le rôle de cette intégrine, plus précisément du variant $\alpha 6\text{A}$, dans le cancer colorectal est toutefois peu connu. Cependant, une étude du laboratoire du Pr Jean-François Beaulieu a démontré que la surexpression du variant $\alpha 6\text{A}$ dans la lignée adénocarcinomateuse de côlon Caco-2/15 augmente l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, tandis que la surexpression du variant $\alpha 6\text{B}$ entraîne une baisse de la prolifération et une chute de l'activité transcriptionnelle de MYC (Dydenborg *et al.*, 2009b; 2009a). Ces observations supportent la possibilité que l'inclusion du variant $\alpha 6\text{A}$ dans l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ génère une intégrine proproliférative ayant des fonctions importantes dans la carcinogenèse colorectale.

1.14 Les hypothèses et objectifs

Au fil des années, l'amélioration des traitements et la mise en place de tests diagnostiques ont permis de diminuer le taux de mortalité du cancer colorectal. Cependant, pour les stades avancés, le taux de survie reste très faible. Pour cette raison, la compréhension des événements impliqués dans la carcinogenèse colique est essentielle pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux marqueurs précoces. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ a été identifiée pour être un récepteur possédant des fonctions protumorales. Plus précisément, les études ont déterminé que la sous-unité $\alpha 6$ régule la prolifération et la tumorigenèse de plusieurs types de cellules de cancers humains. Toutefois, le rôle précis de la participation

du variant $\alpha 6A$ dans la signalisation proliférative de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'est pas établi. Conséquemment, le but de mon projet de recherche est d'identifier le rôle possible et le mécanisme d'action du variant $\alpha 6A$ au sein de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans la carcinogenèse colorectale humaine, en plus de comprendre par quel mécanisme son expression est régulée. Tel que décrit précédemment, la voie Wnt/ β -caténine est un puissant médiateur de la prolifération cellulaire et est hyperactive dans la majorité des cancers colorectaux. Le fait que la surexpression du variant $\alpha 6A$ augmente l'activation de la voie Wnt/ β -caténine démontre son potentiel proprolifératif dans le cancer colorectal. En ce sens, l'hypothèse de mes travaux de thèse est que la fonction protumorale de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est en partie générée par le variant $\alpha 6A$. Plus précisément, selon les résultats précédents démontrant une baisse du ratio des variants $\alpha 6B/\alpha 6A$ associée à une présence accrue du variant $\alpha 6A$ dans les tumeurs primaires de cancer colorectal humain, nous proposons que la surexpression de la sous-unité $\alpha 6$ dans le cancer colorectal humain soit le résultat de l'augmentation du variant d'épissage alternatif $\alpha 6A$. Puisque la surexpression du variant $\alpha 6A$ augmente l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, nous proposons également que le variant $\alpha 6A$ contrôle la prolifération des cellules de cancer colorectal humain et favorise la progression des tumeurs via une régulation de la voie Wnt/ β -caténine. Toutefois, le mécanisme de régulation de l'expression du variant $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal humain est inconnu. En se basant sur les récentes études démontrant que MYC régule l'épissage alternatif, qu'il est surexprimé dans la majorité des cancers colorectaux humains et que le promoteur du gène de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ contient 1 site de liaison reconnu par l'hétérodimère MYC/MAX, nous proposons que l'expression du variant $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal humain est régulé principalement par MYC. Afin de valider ces hypothèses de recherche, quatre objectifs sont établis.

Objectif #1

Valider que l'augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ est causée par la surexpression spécifique de son variant d'épissage alternatif $\alpha 6A$ dans les cancers colorectaux humains.

Objectif #2

Déterminer l'impact de l'abolition du variant $\alpha 6A$ dans les cellules adénocarcinomeuses colorectales humaines sur les processus cellulaires impliqués dans la carcinogenèse tels que la prolifération et l'apoptose, et conséquemment sur leur potentiel tumorigénique *in vivo*.

Objectif #3

Élucider la signalisation et le mécanisme d'action du variant $\alpha 6A$ impliqués dans la fonction proliférative de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$, en focalisant sur la voie Wnt/ β -caténine et sa régulation par la protéine DVL2.

Objectif #4

Déterminer le rôle du proto-oncogène *MYC* sur l'expression et l'épissage alternatif de l'exon 25 de l'ARN pré-messager de la sous-unité $\alpha 6$ dans un contexte du cancer colorectal humain.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Anticorps primaires et matériels

Les anticorps primaires utilisés pour la détection des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ sont : anti- $\alpha 6A$ (IB : 1/500, IF : 1/100) (1A10, Millipore, Etobicoke, ON), anti- $\alpha 6B$ (IB : 1/500, IF : 1/100) (6B4, Millipore). Les autres anticorps primaires utilisés sont : anti-intégrine $\beta 4$ (IB : 1/5000, IF : 1:100) (3E1, Life Technology Inc., Burlington, ON, Canada), anti-intégrine $\alpha 6$ (IB : 1/500, IF : 1/1000) (GOH3, BD Bioscience, Mississauga, ON) reconnaissant le domaine extracellulaire commun aux deux variants, anti- β -actine (IB : 1/75000) (C4, Millipore), anti-active- β -caténine (IB : 1/2500) (clone 8E7, Millipore) reconnaissant la forme déphosphorylée de la β -caténine sur la serine 37 et la thréonine 41 (sites de phosphorylation par la GSK3 β), anti β -caténine (IB : 1/2500) (610153, BD Bioscience), anti-DVL2 (IB : 1/2500) (30D2, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-DVL (IF : 1/100) (G-19, Santa Cruz), anti-cytokératine 18 (IB : 1/1000000) (CY-90, Sigma-Aldrich, Oakville, ON), anti-histone H1 (IB : 1/1000) (AE-4, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), anti-intégrine $\beta 1$ (IB:1/1000) (Mab13, BD Bioscience), anti-GSK3 β (27C10, Cell Signaling Technology), anti-H3K27me3 (IB : 1/1000) (07-449, Millipore), anti-MYC (IB : 1/5000) (Ab32072, Abcam, Burlington, ON, Canada), anti-HNRNPA2B1 (IB : 1/5000) (R4653, Sigma), anti-ESRP2 (IB : 1/1000) (GTX123665, Genetex, Irvine, CA), anti-pThr389 RPS6KB1 (IB : 1/1000) (9205, Cell Signaling Technology), anti-p62 (IB: 1/4000, IF: 1:1000) (clone 3/P62 LCK ligand, BD Bioscience), anti-LC3 (IB : 1/1000) (L8918, Sigma-Aldrich), anti-PRICKLE1 (IB :1 :5000) (A01, Abnova). L'inhibiteur de la GSK3 β (SB216763, S3442, Sigma-Aldrich) est reconstitué dans le DMSO (solution stock à 20 mM) et utilisé à une concentration finale de 20 μ M. L'inhibiteur de DVL (322338 DVL-PDZ Domain Inhibitor II, Millipore) est utilisé reconstitué dans le DMSO (solution stock à 50 mM) et utilisé à une concentration finale de 100 μ M pour les cellules DLD-1 et 50 μ M pour les cellules T84. L'inhibiteur de MYC (10058-F4, Millipore) est reconstitué dans le DMSO (solution stock à 40 mM) et utilisé à des concentrations finales de 50 μ M et 100 μ M. L'inhibiteur bafilomycine A1 (19-148, Millipore) est reconstitué dans le DMSO (solution stock à 160 mM) et utilisé à des

concentrations finales de 50 nM. L'inhibiteur rapamycine (Sigma- Aldrich, 53123-88-9) est reconstitué dans le DMSO (solution stock à 10 mM) et utilisé à des concentrations finales de 10 μ m. Le cocktail d'inhibiteur de protéases (P8340) est acheté de Sigma.

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps utilisés.

Anticorps	Monoclonal/Polyclonal	Espèce
anti-intégrine α 6A	Monoclonal	Souris
anti-intégrine α 6B	Monoclonal	Souris
anti-intégrine α 6	Monoclonal	Rat
anti-intégrine β 4	Monoclonal	Souris
anti-intégrine β 1	Monoclonal	Rat
anti- β -actine	Monoclonal	Souris
anti- β -caténine active	Monoclonal	Souris
anti- β -caténine	Monoclonal	Souris
anti-DVL	Polyclonal	Chèvre
anti-DVL2	Monoclonal	Lapin
anti-cytokératine 18	Monoclonal	Souris
anti-histone H1	Polyclonal	Lapin
anti-GSK3 β	Monoclonal	Lapin
anti-H3K27me3	Polyclonal	Lapin
anti-MYC	Monoclonal	Lapin
anti-HNRNPA2B1	Monoclonal	Souris
anti-ESRP2	Polyclonal	Lapin
anti-pThr389 RPS6KB1	Polyclonal	Lapin
anti-P62	Monoclonal	Souris
anti-LC3	Polyclonal	Lapin
anti-PRICKLE1	Polyclonal	Souris

2.2 Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires de cancer colorectal humain HT29, DLD-1 et T84 ont été obtenues et cultivées selon les instructions fournies par ATCC (www.ATCC.org). Les cellules Caco-2/15 sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté de 1 % Glutamax (GIBCO), 1 % HEPES (GIBCO), 10 % sérum de veau fœtal comme décrit précédemment (Vachon et Beaulieu, 1992). Les cellules normales intestinales humaines (HIEC) ont été développées par le laboratoire du professeur Jean-François Beaulieu, isolées à partir d'intestin fœtal humain (Perreault et Beaulieu, 1996). Les cellules ont été cultivées dans un milieu OptiMEM (Invitrogen) supplémenté de 1 % Glutamax (GIBCO), 1 % HEPES (GIBCO),

5 % sérum de veau fœtal et 5 ng/ml de EGF (BD Biosciences). Toutes les cellules ont été incubées dans une atmosphère de 95 % air et de 5 % CO₂ à 37 °C.

2.3 Génération des cellules exprimant le shARN ciblant la sous-unité intégrine $\alpha 6A$, et le facteur d'épissage HNRNPA2B1

Les cellules de cancer colorectal ont étéensemencées à 60 % de confluence 24 h avant l'infection avec des lentivirus préparés à partir de différents plasmides pLKO.1-puro contenant un shARN MISSION[®] (Sigma-Aldrich) ciblant l'ARNm du variant $\alpha 6A$ ou le facteur d'épissage HNRNPA2B1. Un shARN ciblant l'ARNm de la GFP (Sigma-Aldrich) a été utilisé comme contrôle. Les séquences des différents shARNs utilisés sont montrées dans le Tableau 2. La production de lentivirus contenant les shARNs a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (Benoit *et al.*, 2009). Trois jours après l'infection, les cellules ont été sélectionnées en ajoutant 5-10 μ g/ml de puromycine au milieu de culture (Qiagen, Mississauga, ON) pour la génération de populations cellulaires stables exprimant les différents shARNs. Les cellules exprimant de façon stable les différents shARNs ont été utilisées pour les expériences 14 jours après l'infection et la sélection est maintenue pour toute la durée des expériences.

Tableau 2 : Séquences des shARNs

shARN	séquences
sh $\alpha 6A$	5'-CCGGCCTTTGGACTGAAAGGAGAACTCGAGTTTCTCCTTTCAGTCCAAAGGTTTTTG
shhnRNPA2B1-1	5'-CCGGAGAAGCTGTTTGTGGCGGAACCTCGAGTTCCGCCAACAAACAGCTTCTTTTTT
shhnRNPA2B1-2	5'-CCGGAGCCAGGATCATGGTGTAATACTCGAGTATTACACCATGATCCTGGCTTTTTTG
shhnRNPA2B1-3	5'-CCGGTGACAACATATGGAGGAGGAACTCGAGTTTCTCCTCCATAGTTGTCATTTTT
shcontrole-GFP	5'-CCGGGTGGG CATCAA AGACGTGTTTCTCGAGAAACACGTCTTTGATGCCCACTTTTTTG

2.4 Courbe de croissance

Les populations cellulaires stables de T84, Caco-2/15, HT29 et DLD-1 exprimant le shctrl et le sh $\alpha 6A$ ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 2×10^5 cellules

par puits. Les cellules ont été ensuite comptées à différents jours post-ensemencement en utilisant un appareil compteur de particule Z1 Coulter Counter (Beckman, Mississauga, ON). Pour les expériences avec l'inhibiteur de DVL, les populations cellulaires stables de T84 et DLD-1 exprimant les shctrl et sh α 6A ont été ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 2, 5 $\times 10^5$ et 2 $\times 10^5$ cellules respectivement par puits. Après 24 h de culture, les cellules ont été traitées avec 50 μ M pour les T84 et 100 μ M pour les DLD-1 d'inhibiteur de DVL ou avec le DMSO pendant 48 h. Les cellules ont été comptées en utilisant le compteur cellulaire automatique TC20™ Automated Cell Counter (Bio-rad).

2.5 Essai d'incorporation de BrdU

La prolifération cellulaire des populations cellulaires stables de T84, Caco-2/15, HT29 et DLD-1 exprimant le shctrl et le sh α 6A a été déterminée par essai d'incorporation de la 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) en utilisant la trousse BrdU Labeling and Detection Kit I (Roche, Laval, QC), selon les instructions du manufacturier. Brièvement, les cellules sont ensemencées à une concentration de 50 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits sur des lamelles de verre prétraitées avec du sérum de veau fœtal. Quarante-huit heures plus tard, le BrdU est ajouté au milieu de culture pendant 1 h à 37 °C. Les noyaux sont colorés avec le DAPI (2 μ M) et les cellules ayant incorporées le BrdU sont visualisées à l'aide du microscope à épifluorescence DMRXA microscope (Leica) équipé d'une caméra digitale (RTE/CCD Y/Hz-1300 cooled camera). Le ratio de cellules prolifératives est évalué par le nombre de cellules positives au BrdU par rapport au nombre total de cellules marquées au DAPI.

2.6 Analyse de l'apoptose par marquage enzymatique des extrémités fragmentées de l'ADN par la méthode ISEL (*In situ* terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP nick-end labeling)

Le nombre de cellules apoptotiques dans les populations cellulaires stables de T84, Caco-2/15, HT29 et DLD-1 exprimant le shctrl et le sh α 6A a été évalué par un marquage enzymatique des extrémités fragmentées de l'ADN en utilisant la trousse ApopTag® Plus

Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (S7111, Millipore) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été ensemencées à une concentration de 50 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits sur des lamelles de verre prétraitées avec sérum de veau fœtal. L'essai ISEL a été effectué après 48 h de culture. Les noyaux ont été marqués par le DAPI (2 μ M). Les cellules ISEL-positives ont été visualisées à l'aide du microscope à épifluorescence DMRXA microscope (Leica) équipé d'une caméra digitale (RTE/CCD Y/Hz-1300 cooled camera). Le pourcentage de cellules apoptotiques a été déterminé en calculant le nombre de cellules positives au ISEL par rapport au nombre total de cellules marquées au DAPI, X 100. Un contrôle positif d'apoptose a été effectué en ajoutant une concentration de 1 μ M de cytochalasine D (Sigma-Aldrich).

2.7 Tissus de cancer colorectal humain

Les échantillons de 97 tissus de cancer colorectal humain et leur marge de résection correspondante (au moins à 10 cm de la tumeur) ont été obtenus chez des patients subissant une résection chirurgicale sans traitement néoadjuvant au préalable. Les tissus ont été obtenus après consentement écrit des patients, selon un protocole approuvé par le comité institutionnel de la recherche sur les sujets humains du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). Le diagnostic histologique ainsi que le stade et le grade des tumeurs ont été déterminés par un médecin pathologiste du département de pathologie du CHUS.

2.8 Extraction de l'ARNm et génération des ADNc

L'ARN total provenant des tissus de cancer colorectal et de leurs marges de résection correspondantes ont été extraits en utilisant la trousse RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74136). La concentration et l'intégrité de l'ARN total (RIN) de chaque échantillon ont été validées par micropuce d'analyse d'ARN Agilent RNA 6000 Nano Kit et lues par l'appareil Agilent 2100 bioanalyser. La transcription inverse a été ensuite réalisée en utilisant l'enzyme AMV (AMV-RT kit, Roche Diagnostics, 10109118001) selon les instructions du fabricant. L'ARN provenant des cellules en culture a été extrait en utilisant la technique TriPure (Roche, Laval, Qc). L'intégrité de l'ARN total a été vérifiée par

l'analyse des bandes 28S et 18S sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium. La concentration des extraits d'ARN totaux a été quantifiée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260nm/280nm et l'intégrité a été vérifiée par l'analyse des bandes 28S et 18S sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium. Les ARN totaux ont subi un traitement à la DNase pour dégrader l'ADN génomique avant la réaction de la transcription inverse. La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN total en utilisant l'enzyme Omniscript reserve transcriptase (Quiagen) en présence d'oligonucléotides (nt) (Amersham Pharmacia Biotech) comme décrit précédemment (Ni *et al.*, 2005). 10 ng d'ADNc par réaction ont été utilisés pour la PCR compétitive et la PCR quantitative.

2.9 Réaction de polymérase en chaîne (PCR) compétitive et PCR quantitative en temps réel

La PCR compétitive pour coamplifier $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ a été réalisée dans les conditions et avec les amorces précédemment décrites (Dydensborg *et al.*, 2009b). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant l'appareil MXP3000P Real-Time System (Stratagene). La quantification par PCR quantitative des gènes des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ a été effectuée en utilisant le système de PrimeTime assay (IDT, Coralville, IA) comprenant une sonde d'hydrolyse couplée au fluorophore FAM, une amorce sens et une amorce anti-sens (Tableau 3). Le mélange réactionnel 2X Brilliant® III probe (Stratagene) a été utilisé pour ces réactions. Le protocole d'amplification comprend une première étape d'activation de l'enzyme Taq polymérase pendant 3 minutes à 95 °C, suivi de 40 cycles d'amplification en deux étapes. La première étape consiste en la dénaturation des brins pendant 20 secondes à 95 °C, et la seconde en l'hybridation/élongation des brins pendant 20 secondes à 60 °C. Les lectures de fluorescence (FAM) ont été acquises par l'appareil après chaque phase d'hybridation/élongation. La quantification par PCR quantitative de tous les autres gènes a été réalisée en utilisant des paires d'amorces sens et anti-sens (Tableau 4) avec le mélange réactionnel 2X Brilliant® II SYBR® Green. Le protocole d'amplification comprend une première étape d'activation de l'enzyme Taq polymérase pendant 10 minutes à 95 °C, suivie de 40 cycles d'amplification en trois étapes comprenant une étape de dénaturation

des brins de 30 secondes à 95 °C, une étape d'hybridation des brins pendant 30 secondes à 55 °C, suivie d'une dernière étape d'élongation des brins de 1 minute à 72 °C. Les lectures de fluorescence (SYBERGreen) ont été acquises par l'appareil après chaque phase d'hybridation. La spécificité de l'amplification a été confirmée par l'étalement d'une courbe de dissociation du produit d'amplification final des réactions de PCR quantitative. Le gène *B2M* (β -2-microglobulin) a été utilisé comme gène de référence pour l'analyse des tissus humains tandis que le gène *RPLPO* a été utilisé comme gène de référence pour l'analyse des lignées cellulaires, conformément à l'étude publiée précédemment par le laboratoire sur l'utilisation de gènes de références appropriés dans l'intestin normal et le cancer colorectal. L'expression relative des transcrits a été calculée en comparant l'expression du gène d'intérêt de chaque échantillon avec son expression dans un échantillon contrôle contenant l'ADNc de différentes lignées cellulaires intestinales normales et cancéreuses (HIEC, T84, HT29, DLD-1, HCT116, Caco-2/15 sous-confluent, Caco-2/15 confluent) selon le modèle mathématique de Pfaffl utilisant l'efficacité d'amplification des amorces (Pfaffl, 2001). L'efficacité de la réaction d'amplification de chaque gène a été déterminée par une courbe standard comprenant différentes dilutions d'un même ADNc ou avec un plasmide exprimant le gène d'intérêt.

Tableau 3 : Séquences des amorces et sondes pour l'amplification des variants α 6A et α 6B en PCR quantitative

Gènes	séquences	
variant α 6A	Amorce sens	5' GATCCTTACAGCATGGTATCGG
	Amorce anti-sens	5' AAGAGAGGCTTACTTCTGATGC
	sonde	56-FAM/TCGTACCTA/ZEN/GAGCGT TTAAAGAATCCACAC/3IABkFQ
variant α 6B	Amorce sens	5' ATTCTCGCTGGGATCTTGATG
	Amorce anti-sens	5' GATCCTTACAGCATGGTATCGG
	sonde	56-FAM/TGGAAGTGT/ZEN/GGA TTCTTTAAACGCTCT/3IABkFQ

Tableau 4 : Séquence des amorces utilisées pour l'amplification des gènes en PCR quantitative

Symboles	Noms	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>RPLP0</i>	Ribosomal protein large P0	5' TCGACAATGGCAGCATCTAC	5' GCCTTGACCTTTTCAGCAAG
<i>B2M</i>	β -2-microglobulin	5' GTGCTCGCGCTACTCTCTC	5' GTCAACTTCAATGTCGGAT
<i>itga6</i>	Intégrine α 6	5' GTGGGATATGCCTCCAGGTT	5' TGTAGCCACAGGGTTTCCTC
<i>MYC</i>	V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	5' CCTACCCTCTCAACGACAGC	5' CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
<i>LGR5</i>	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	5' TGCTCTTCACCAACTGCATC	5' CTCAGGCTCACCAGATCCTC
<i>CCND2</i>	Cycline D2	5' TCATCGACGGTGGGTACAT	5' AACTACCTGGACCGCTTCCT
<i>CCND1</i>	Cycline D1	5' AACTACCTGGACCGCTTCCT	5' CCACTTGAGCTTGTTACCA
<i>HNRNPA2B1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	5' GGCTACGGAGGTGGTTATGA	5' ATAACCCCACTTCCTCCAC
<i>ESRP2</i>	Epithelial splicing regulatory protein 2	5' CCCCTGTTGCCTACTATCCA	5' ACGCTGAGCAGATCCTTCAT
<i>itgb1</i>	intégrine β 1	5' CATCTGCGAGTGTGGTGTCT	5' CATCTGCGAGTGTGGTGTCT
<i>itgb4</i>	intégrine β 4	5' GTGGAGTACCAGCTGCTGAA	5' GGACACAGTGGGATCTGC
<i>VHL</i>	von Hippel-Lindau tumor suppressor E3 ubiquitin protein ligase	5' GAGTACGGCCCTGAAGAAGA	5' GCGATTGCAGAAGATGACCT
<i>PRICKLE1</i>	Prickle homolog 1	5' GACAGTCTCTCCTTATCG	5' GGATTGAGACTTGGACCTTC
<i>DVL2</i>	Dishevelled segment polarity protein 2	5' GCCTATCCAGGTTCTCCTC	5' AGAGCCAGTCAACCACATCC
<i>ESRP1</i>	Epithelial splicing regulatory protein 1	5' AAGCTGCGGACAGAGCATT	5' AGCAGGAGCTGGAAATGTGT
<i>PTBP1</i>	Polypyrimidine Tract Binding Protein	5' AGGGCCTGACCAAGGACTAC	5' TCTGGATCAGTGCCATCTTG
<i>HNRNPA1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	5' AGGAGCCATTTGAGCAATG	5' TTAAGTGGGCACCTGGTCTT
<i>HNRNPH1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	5' ATGGGCTTGTCAAACCAGTC	5' CCTATGCAATGTTTGATTGAAA

2.10 Immunofluorescence

Les populations cellulaires stables T84 shctrl et T84 sh α 6A ont étéensemencées à une concentration de 50 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits sur des lamelles de verre prétraitées au sérum de veau fœtal. Le protocole d'immunofluorescence est initié 48 h après l'ensemencement des cellules. Pour la détection des sous-unités intégrine α 6 et β 4, les cellules ont été fixées dans une solution de 2 % paraformaldéhyde dilué dans le PBS, et les sites non spécifiques ont été bloqués 1 heure à la température de la pièce dans une solution de 5 % lait sans lipide dilué dans le PBS. Les anticorps anti- α 6 et anti- β 4 ont été dilués dans la solution de blocage et incubés toute la nuit à 4 °C. Pour l'immunofluorescence des variants α 6A et α 6B, les cellules ont été fixées respectivement avec du méthanol 100 % et de l'éthanol 100 % 10 minutes à -20 °C. Les sites non spécifiques ont été bloqués 1 heure à la température de la pièce avec une solution d'albumine sérique bovine 2 % diluée dans le PBS. Les anticorps anti- α 6A et anti- α 6B ont été dilués dans la solution de blocage et ont été incubés toute la nuit à 4 °C. La détection de DVL et p62 par immunofluorescence a été effectuée dans les T84 shctrl et sh α 6A.

Quarante-huit heures après leur ensemencement, les cellules T84 shctrl et sh α 6A ont été traitées pendant 24 heures avec 10 μ M de bafilomycine. Les cellules ont ensuite été fixées dans une solution de 2 % paraformaldéhyde dilué dans le PBS, et les sites non spécifiques ont été bloqués 1 heure à température de la pièce dans une solution de 5 % lait sans lipide dilué dans le PBS. Les anticorps anti-DVL et anti-P62 ont été dilués dans la solution de blocage et incubés toute la nuit à 4 °C. Dans tous les cas, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de 0.2 % triton X-100 diluée dans le PBS pendant 5 minutes avant incubation avec l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires ont été incubés 1 heure à température de la pièce dans la solution de blocage utilisé pour les anticorps primaires respectifs. Les anticorps primaires ont été détectés par les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 ou 594 chèvre anti-souris (Invitrogen, A11017, A11072) et l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 chèvre anti-rat (Invitrogen, A11006). Les noyaux ont été marqués par le DAPI (2 μ M) et les cellules ont été visualisées à l'aide du microscope à épifluorescence DMRXA microscope (Leica) équipé d'une caméra digitale (RTE/CCD Y/HZ-1300 cooled camera).

2.11 Immunobuvardage

Les lysats protéiques cellulaires totaux ont été récoltés dans le Laemmli 1X (2.3 % SDS, 10 % glycérol, 0.001 % bleu de bromophénole, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8), soniqués 15 fois, chauffés 5 minutes à 100 °C et débarrassés des débris cellulaires non solubles par centrifugation à 15 000 rpm pendant 5 minutes. Les concentrations en protéines ont été déterminées par dosage colorimétrique selon la méthode de Lowry. Cinquante à 100 μ g de protéines ont été séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE d'une concentration variant entre 8 et 15 %, dépendant du poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Dans le cas de l'immunobuvardage effectué pour la détection de la sous-unité intégrine α 6 et des variants α 6A/ α 6B, la séparation sur gel d'électrophorèse a été réalisée dans des conditions non réductrices (sans β -mercaptoéthanol), tandis que toutes les autres protéines ont été séparées dans des conditions réductrices (avec β -mercaptoéthanol). Après la séparation des protéines dans le gel, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués pendant une heure à la température

ambiante avec une solution d'albumine sérique bovine 2 %, 0.1 % de Tween -20 (Biorad) dilués dans le PBS ou une solution de 5 % de lait sans lipide, 0.1 % de Tween -20 (Biorad) dilués dans le PBS, étape suivie de l'incubation des membranes avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage appropriée pendant 18 heures à 4 °C. Les membranes ont été lavées trois fois pour une durée de 10 minutes avec le PBS contenant 0.1 % de Tween -20 et incubées avec les anticorps secondaires conjugués à l'enzyme HRP dilué 1/5000 dans la solution de blocage pour 1 heure à la température ambiante (anti-lapin, anti-souris, anti-rat, GE Healthcare Amersham Bioscience, Baie d'Urfe, QC). Après trois lavages de 10 minutes dans le tampon PBS contenant 0.1 % Tween -20, la présence des complexes anticorps primaires/anticorps secondaires a été révélée en utilisant la réaction de chimioluminescence Immobilon Western® kit (Millipore) et l'émission de lumière a été détectée en utilisant un film d'autoradiographie (Amersham Pharmacia Biotech).

2.12 Extraction nucléaire

Les extraits protéiques nucléaires ont été préparés en utilisant des cellules à 80 % de confluence. Brièvement, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS et récoltées avec 4 ml de PBS. Les cellules ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C puis remises en suspension rapidement dans un tampon hypotonique (10 μ M HEPES, 1.5 μ M $MgCl_2$, 3 μ M KCL, 0.5 μ M DTT et 1 % d'inhibiteur des protéases dans H_2O bidistillée) pour être ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant a été retiré et les culots remis en suspension dans le TH pendant 10 minutes à 4 °C. Les culots ont ensuite été homogénéisés avec un micropilon B et centrifugées pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et les culots remis en suspension dans un tampon faible en sel (20 μ M HEPES, 1.5 μ M $MgCl_2$, 6 μ M KCL, 25 % glycérol, 0.2 μ M EDTA, 5 μ M DTT et 1 % d'inhibiteur des protéases dans H_2O bidistillée) suivi d'un tampon riche en sel (20 μ M HEPES, 1.5 μ M $MgCl_2$, 0.4 M KCL, 25 % glycérol, 0.2 μ M EDTA, 5 μ M DTT et 1 % d'inhibiteur de protéases dans H_2O bidistillée), agité pendant 30 minutes à 4 °C et centrifugé à 14 000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires a été solubilisé dans le tampon Laemmli 4X.

2.13 Fractionnement cellulaire

Le fractionnement subcellulaire a été effectué en utilisant la trousse Subcellular Proteome Extraction Kit (539790, Millipore) selon les instructions du fabricant. Les cellules DLD-1 shctrl et DLD sh α 6A ont été cultivées trois jours (80 % de confluence) avant l'extraction des fractions cellulaires (F1 : cytosolique; F2 : membrane; F3 : nucléaire; F4 : cytosquelette). Les fractions enrichies ont été confirmées par immunobuvardage pour la détection de la GSK3 β (fraction cytoplasmique soluble), l'intégrine β 1 (fraction de membrane), la triméthylée lysine 27 de l'histone 3 (fraction nucléaire) et la kératine 18 (fraction du cytosquelette).

2.14 Plasmides, transfection et essai luciférase

Le plasmide rapporteur de la luciférase TOPflash (Promega) contient trois sites de liaison du complexe β -caténine/TCF4 en amont du promoteur minimal de la thymidine kinase, contrôlant l'expression du gène de la luciférase firefly. Le plasmide rapporteur de la luciférase FOPflash (Promega) contenant des sites de liaison du complexe β -caténine/TCF4 mutés a été utilisé comme contrôle négatif. Le plasmide pRL (Promega) dont l'expression de la luciférase renilla est constitutive a été utilisé en co-transfection avec les plasmides TOPflash/FOPflash comme contrôle interne de l'efficacité de la transfection. Le plasmide pLightSwitch- α 6 (S708174, SwitchGear Genomic) contient le gène de la luciférase renilla sous le contrôle du promoteur de la sous-unité intégrine α 6. Le plasmide pLightSwitch-empty (S790005, SwitchGear Genomic) contenant le gène de la luciférase renilla sans promoteur a été utilisé comme contrôle négatif. Le plasmide pGL4.13[*luc2*/SV40] dont l'expression de la luciférase firefly est constitutif a été utilisé en co-transfection avec les plasmides pLightSwitch- α 6/pLightSwitch-empty comme contrôle interne de l'efficacité de transfection. Les plasmides utilisés pour la surexpression de MYC et MADMYC (PCDNA-vide, PCDNA-MYC, CVMT-MADMYC) ont été décrits précédemment (Ni *et al.*, 2005). Dans le cas du mutant dominant négatif, MADMYC, le domaine de transactivation N-terminal de MYC (acides aminés 1 à 263) a été retiré et remplacé par le domaine N-terminal de la répression transcriptionnelle (acides aminés 1 à

38, la région d'interaction Sin3) de MAD. Les plasmides ont été transfectés avec l'agent de transfection Effectene (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'activité des luciférase firefly/renilla a été mesurée par chimioluminescence 48 heures après la co-transfection en utilisant le système Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI). Le signal de chimioluminescence a été détecté par l'appareil Orion microplate luminometer (Berthold, Kirkland, QC). Pour les expériences d'analyse de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine, les populations cellulaires stables de T84, Caco-2/15, HT29 et DLD-1 exprimant le shctrl et le sh α 6A ont été ensemencées à une concentration de 50 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur de la luciférase firefly TOPflash ou le plasmide rapporteur de la luciférase firefly FOPflash et le plasmide pRL. Dans certaines expériences, les cellules ont été traitées avec le DMSO ou le SB216763 pendant 48 heures. Pour les expériences de l'activité du promoteur de la sous-unité intégrine α 6, les cellules 293T, T84, SW620, Caco-2/15 ont été ensemencées à une concentration de 50 000 par puits dans une plaque 24 puits (Falcon). Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur de la luciférase renilla pLightSwitch- α 6 ou pLightSwitch-empty, le plasmide rapporteur de la luciférase firefly pGL4.13 [*luc2*/SV40], en combinaison avec les plasmides PCDNA-vide, PCDNA-MYC, CVMT-MAD/MYC. Les données ont été obtenues en calculant le ratio de l'expression de la luciférase renilla par rapport à celui de la luciférase firefly. Le ratio obtenu pour le plasmide contrôle négatif (FOPflash ou pLightSwitch-empty) a été soustrait du ratio obtenu pour le plasmide rapporteur d'intérêt (TOPflash ou pLightSwitch- α 6). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.15 Xénogreffe

Les souris femelles CD1 nu/nu ont été achetées de Charles River (Wilmington, MA). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique sur les expérimentations animales de l'université de Sherbrooke. Les populations cellulaires stables de T84, HT29 et DLD-1 exprimant le shctrl et le sh α 6A ont été injectées en sous-cutané au niveau du dos de souris âgées de 5 semaines. Pour chaque type cellulaire, un total

de 2×10^6 de cellules suspendues dans 100 μ l de milieu de culture a été injecté. Dès que la tumeur a été palpable, le volume tumoral des xénogreffes a été déterminé par deux mesures du diamètre de la tumeur ($V = (d^2 \times D)/2$) à l'aide d'un pied à coulisse. Le suivi du bien-être des animaux et des volumes tumoraux a été effectué jusqu'à l'euthanasie des souris. Les tumeurs ont été disséquées et pesées suite à l'euthanasie de l'animal. Un segment de chaque tissu tumoral a été utilisé pour l'extraction d'ARNm et analysé par PCR quantitative. Un autre segment a été inclus dans l'OCT pour étude histologique. Des tranches de 5-10 μ m d'épaisseur ont été coupées avec le cryostat Leica CM3050S sur une lame de verre recouverte de silice (Fisher Scientific, 125523). Ensuite, une coloration hématoxyline/éosine a été effectuée pour l'analyse histologique des tissus tumoraux. Les tissus ont été visualisés avec le microscope FSX100 Bio Imaging Navigator (Olympus, Center Valley, PA, USA).

2.16 Traitement avec l'inhibiteur de MYC

Pour les expériences avec l'inhibiteur de MYC (10058-F4), les cellules T84 ont étéensemencées à une concentration de 200 000 cellules par puits dans une plaque 6 puits. Six jours après l'ensemencement, l'inhibiteur de MYC a été ajouté dans le milieu de culture à une concentration de 50 μ M et 100 μ M pour une période de 24 h et 48 h. L'ARN des cellules a été récolté ainsi que les lysats cellulaires protéiques totaux pour les analyses.

2.17 Analyses statistiques

Chaque expérience a été répétée au moins trois fois sauf lorsque mentionné et les résultats représentatifs ont été montrés. Les données présentées sont exprimées sous la forme d'une moyenne de toutes les expériences +/- l'erreur standard moyenne. Le test t de student unilatéral ou le test d'analyse des variances ANOVA suivit d'un test de comparaisons multiples de type Bonferroni ont été utilisés pour analyser la significativité des données. La différence entre les données a été considérée comme significative lorsque $p \leq 0,05$. Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3. RÉSULTATS

3.1 L'augmentation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de son variant $\alpha 6A$ dans les tumeurs colorectales humaines

Une étude portant sur l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ et ses variants réalisée par notre laboratoire a permis de mettre en évidence une altération du ratio de l'expression des transcrits des variants $\alpha 6B/\alpha 6A$ dans un nombre réduit d'échantillons de cancer colorectal humain, suggérant une augmentation du variant $\alpha 6A$ (Dydensborg *et al.*, 2009b). Dans le but de confirmer ces observations et de réaliser l'objectif 1 de mes travaux de thèse, les niveaux d'expression du transcrit de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ totale ainsi que ses variants d'épissage $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ ont été analysés en PCR quantitative dans 97 tumeurs primaires colorectales humaines et leur marge de résection correspondante. L'expression de la sous-unité $\alpha 6$ totale a été examinée par l'amplification d'une séquence commune pour les deux variants d'épissage alternatif codant pour la région extracellulaire, alors que les variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ ont été analysés par l'amplification d'une séquence spécifique à chaque variant codant pour le domaine cytoplasmique (Tableau 2 et 3). Dans un premier temps, les analyses ont révélé que le transcrit de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ est augmenté de plus de deux fois dans les tumeurs primaires comparativement à leur marge de résection, confirmant les résultats obtenus précédemment par le laboratoire (Dydensborg *et al.*, 2009b) (Figure 7A). Toutefois, l'analyse des variants d'épissage a permis d'observer une hausse significative du variant $\alpha 6A$, alors que le variant $\alpha 6B$ demeure stable (Figure 7A). De plus, l'expression du variant $\alpha 6A$ corrèle fortement avec celle de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ totale ($p \leq 0.0001$, Pearson $r = 0.588$) (Figure 7B), confirmant que l'augmentation de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ dans les tumeurs primaires colorectales se réalise aux dépens de son variant $\alpha 6A$. Lorsque les échantillons sont analysés individuellement, l'expression du transcrit du variant $\alpha 6A$ dans les tumeurs primaires colorectales est augmentée chez 69 patients, est similaire chez 16 patients et réduite chez 12 patients. Prenant en considération le fait que des niveaux considérables du variant $\alpha 6A$ sont exprimés dans la crypte de la muqueuse colique normale de la marge de résection, ces résultats confirment qu'une grande proportion de cellules cancéreuses colorectales

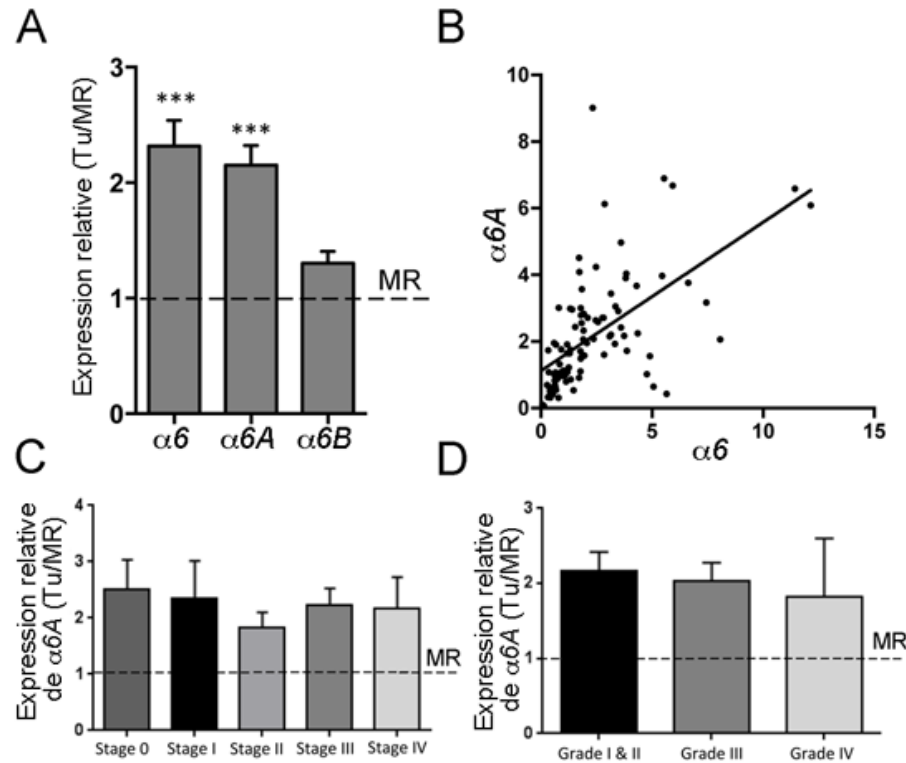


Figure 7 : Expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de ses variants d'épissage alternatif dans les tumeurs primaires colorectales humaines. (A) Analyses en PCR quantitative de l'expression du transcrit de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de ses variants d'épissage alternatif $\alpha 6A/\alpha 6B$ dans 97 tumeurs primaires colorectales humaines (Tu) par rapport à leur marge de résection (MR) correspondante. Les données sont normalisées par rapport à l'expression du transcrit de *B2M* comme gène de référence. Test t de student, *** $p \leq 0.001$. (B) Graphique démontrant la corrélation entre l'expression des transcrits de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de son variant $\alpha 6A$ dans les tumeurs primaires colorectales humaines. Corrélation de Pearson $r=0.588$, $p \leq 0.0001$. (C-D) Analyses en PCR quantitative de l'expression du variant $\alpha 6A$ selon le stade (C) et le grade (D). Test statistique ANOVA, $p \leq 0.05$. Les données sont normalisées par rapport à l'expression du transcrit de *B2M* comme gène de référence. L'expression relative du transcrit du variant $\alpha 6A$ est déterminée relativement à l'expression dans la marge de résection correspondante (MR). Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

expriment d'importants niveaux du variant $\alpha 6A$. De plus, l'augmentation de l'expression du variant $\alpha 6A$ est observée peu importe le stade ou le grade de la tumeur (Figure 7C-D). Ces données confirment la régulation à la hausse soutenue du variant $\alpha 6A$ tout au long de la progression du cancer colorectal humain.

3.2 L'abolition du variant $\alpha 6A$ dans les cellules cancéreuses colorectales humaines

Afin d'étudier l'implication fonctionnelle du variant $\alpha 6A$ dans le comportement des cellules cancéreuses colorectales (objectif 2), quatre lignées cellulaires de cancer colorectal bien caractérisées, soit les Caco-2/15, DLD- 1, T84 et HT29, ont été infectées avec un shARN ciblant le transcrit du variant $\alpha 6A$. Le shARN a été conçu afin de reconnaître une courte séquence dans l'exon 25 (environ 119pb) unique au variant $\alpha 6A$. La spécificité de l'abolition du variant $\alpha 6A$ a été confirmée en PCR compétitive en utilisant des amorces amplifiant les deux variants. Les résultats ont révélé une diminution de l'expression du variant $\alpha 6A$ sans réduire l'expression du variant $\alpha 6B$ dans les cellules infectées avec le sh $\alpha 6A$ par rapport aux cellules infectées avec un shARN contrôle (shctrl), et ce, dans les quatre lignées cellulaires testées (Figure 8A). L'analyse en PCR quantitative a démontré une diminution de 80 à 90 % des niveaux d'expression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules infectées avec le sh $\alpha 6A$ comparativement aux cellules infectées avec le shctrl, sans affecter les niveaux du variant $\alpha 6B$ (Figure 8B). Parallèlement, l'abolition du variant $\alpha 6A$ est accompagné d'une diminution d'environ 50 % de l'expression du transcrit de la sous-unité $\alpha 6$ totale comparativement aux cellules shctrl (Figure 8B). Les expériences d'immunobuvardage ont confirmé la suppression du variant $\alpha 6A$ au niveau de la protéine dans les cellules sh $\alpha 6A$, sans affecter significativement l'expression du variant $\alpha 6B$, et ce, dans toutes les lignées cellulaires utilisées de cancer colorectal (Figure 8C-D).

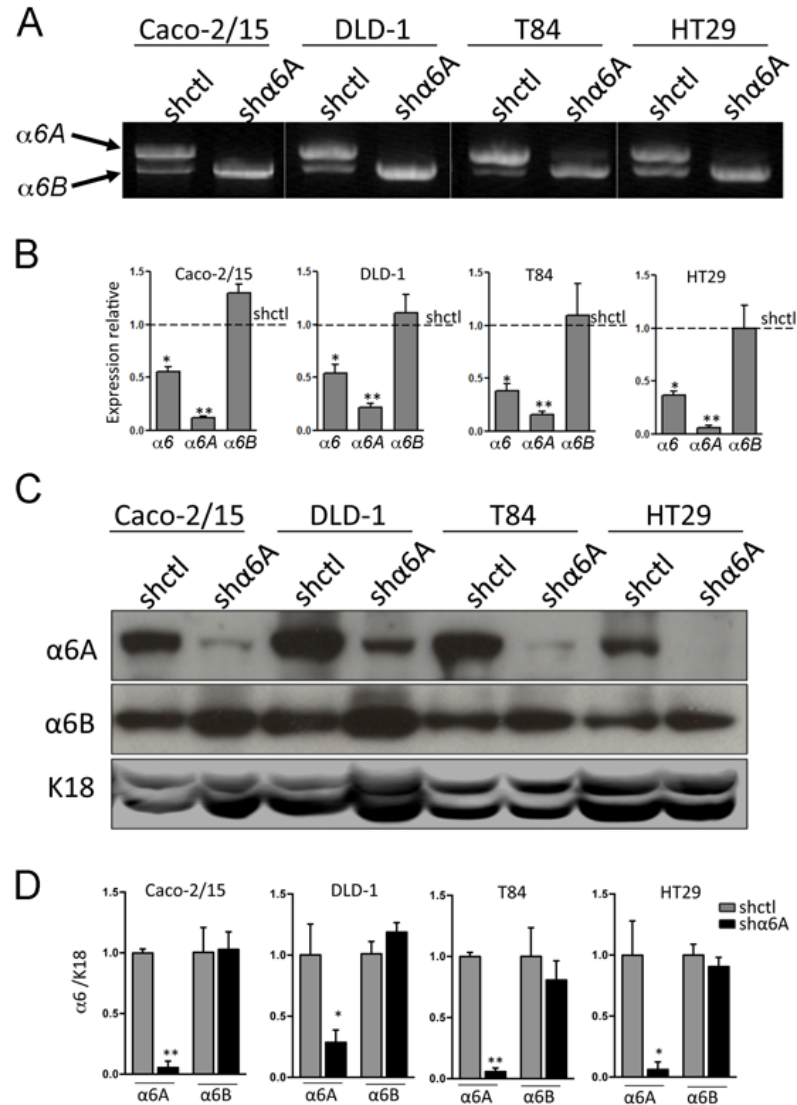


Figure 8 : Abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules de cancers colorectaux humains. (A) Analyses en PCR compétitive de l'expression du transcrite des variants $\alpha 6A/\alpha 6B$ dans les lignées cellulaires Caco-2/15, DLD-1, T84 et HT29 exprimant de façon stable le shARN shctrl et sha6A. N=3 (B) Analyses en PCR quantitative de l'expression des transcrits de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de ses variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$. Test t de student (shctrl vs sha6A), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. N=3. Les données sont normalisées par rapport à l'expression du transcrite du gène de référence *RPLPO*. (C) Immunobuvardages représentatifs pour la détection des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ dans les cellules shctrl et sha6A. La cytokératine 18 (K18) est utilisée comme contrôle de quantité protéique. (D) Graphiques de l'analyse densitométrique des niveaux protéiques des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ dans les cellules shctrl et sha6A. Test t de student (shctrl vs sha6A), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. N=3 Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

3.3 La perte d'expression du variant $\alpha 6A$ n'affecte pas la localisation du variant $\alpha 6B$

Malgré le fait que l'abolition du variant $\alpha 6A$ n'engendre pas un phénomène de compensation par le variant $\alpha 6B$, il est important de déterminer si sa localisation membranaire est affectée. Pour se faire, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées pour la détection simultanée de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de la sous-unité intégrine $\beta 4$ en parallèle avec une immunofluorescence pour la détection des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$. Les cellules T84 ont été utilisées, car elles forment des hémidesmosomes lorsque cultivées en boîtes de Pétri, facilitant ainsi la visualisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ au sein de cette structure d'adhésion. Les résultats ont montré que la sous-unité intégrine $\alpha 6$ colocalise avec le marquage de la sous-unité intégrine $\beta 4$ dans les cellules shctrl et sh $\alpha 6A$ sous forme ponctuée, caractéristique d'un marquage d'hémidesmosomes (Figure 9A-F). Tel qu'attendu, l'intensité du signal du marquage pour les deux sous-unités intégrines $\alpha 6$ et $\beta 4$ est moins forte dans les cellules sh $\alpha 6A$ comparativement aux cellules shctrl. Par la suite, l'utilisation d'anticorps spécifiques pour les variants de la sous-unité $\alpha 6$ a permis d'observer un marquage ponctué du variant $\alpha 6A$ dans les cellules shctrl. Parallèlement, le marquage pour le variant $\alpha 6A$ est quasi absent dans les cellules sh $\alpha 6A$, confirmant l'abolition du variant $\alpha 6A$ (Figure 9G, I). L'analyse du variant $\alpha 6B$ a permis d'observer un marquage également sous une forme ponctuée et d'intensité équivalente au niveau des cellules shctrl et sh $\alpha 6A$ (Figure 9J, H). Ces résultats suggèrent que l'abolition du variant $\alpha 6A$ ne modifie pas la localisation membranaire du variant $\alpha 6B$ dans l'hémidesmosome.

Afin de confirmer cette observation, la localisation et les niveaux d'expression des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ ont ensuite été analysées dans une autre lignée cellulaire de cancer colorectal, soit les cellules DLD-1. Pour ce faire, les niveaux protéiques des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ ont été analysés par immunobuvardage dans un fractionnement cellulaire, car les cellules DLD-1 ne forment pas d'hémidesmosome en boîte de Pétri. Les analyses ont montré que les variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ se retrouvent exclusivement à la membrane plasmique et que l'abolition du variant $\alpha 6A$ n'altère pas la localisation membranaire (fraction F2) du variant $\alpha 6B$ (Figure 9K). Conséquemment à la perte du variant $\alpha 6A$, une diminution de

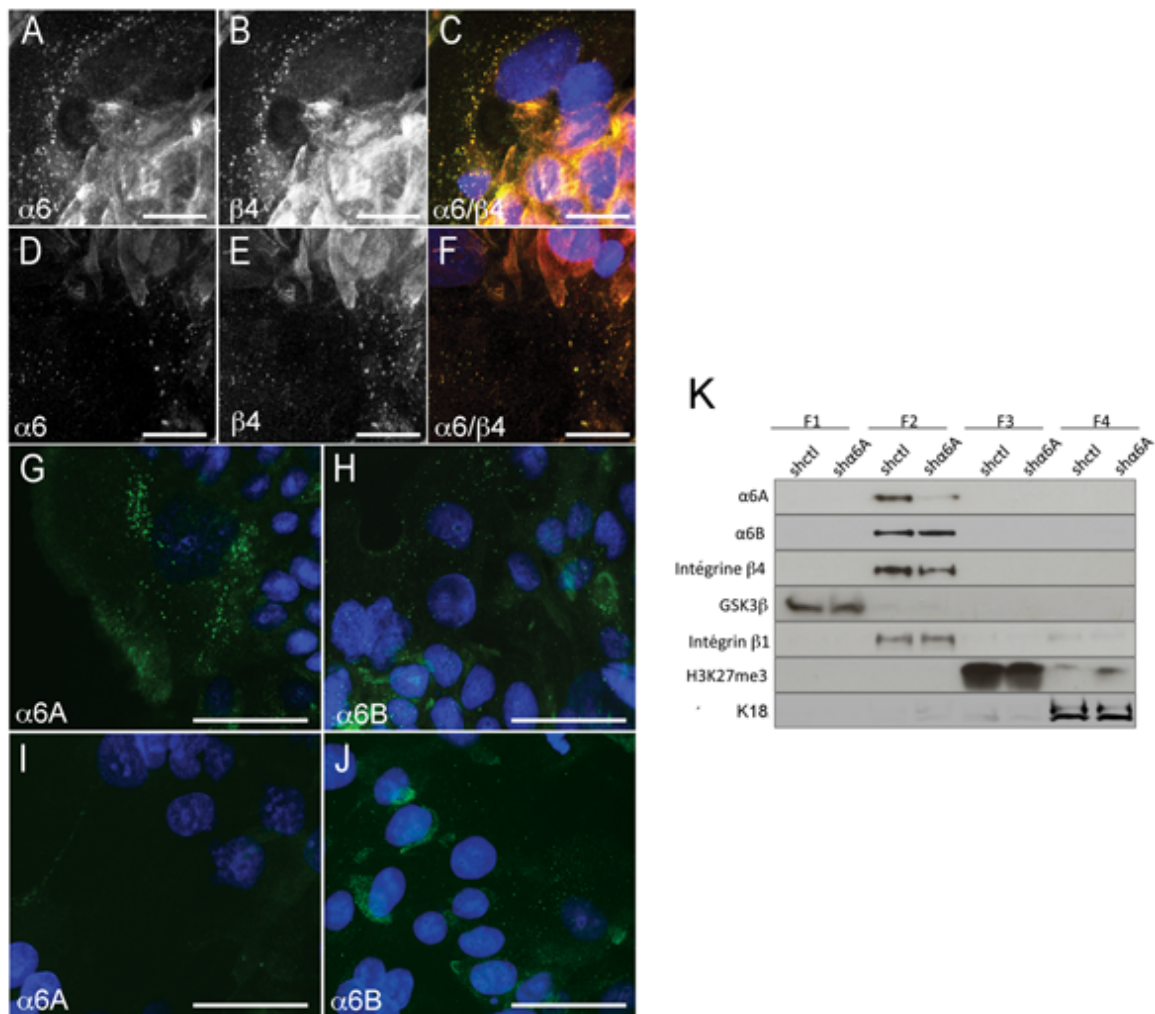


Figure 9 : Localisation du variant $\alpha 6B$ en présence de l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$. (A-J) Immunolocalisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et de ses variants d'épissage dans les cellules T84 shctrl et sh $\alpha 6A$ par immunofluorescence. (A-F) Images représentatives pour la localisation de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ (A, D), de la sous-unité intégrine $\beta 4$ (B, E) et la colocalisation d' $\alpha 6$ (vert), de $\beta 4$ (rouge) et le DAPI (bleu) dans les cellules T84 shctrl (A-C) et T84 sh $\alpha 6A$ (D-F). (G-J) Images représentatives d'immunofluorescence pour la détection du variant $\alpha 6A$ (vert) (G,I), $\alpha 6B$ (vert) (H,J) et le DAPI (bleu) dans les cellules T84 shctrl (G,H) et sh $\alpha 6A$ (I,J). Échelle : A-F=25 μ m; G-J=50 μ m. N=3. (K) Immunobuvardages représentatifs pour la détection des variants intégrines $\alpha 6A$, $\alpha 6B$ et de la sous-unité intégrine $\beta 4$ dans les fractions cytoplasmiques (F1), membranaires (F2), nucléaires (F3) et cytosquelettes (F4) issues des cellules DLD-1 shctrl et sh $\alpha 6A$. Les fractions enrichies F1, F2, F3, F4 ont été validées respectivement par la détection de la GSK3 β , la sous-unité intégrine $\beta 1$, la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) et cytokératine 18 (K18). N=3. Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

l'intégrine $\beta 4$ est constatée par rapport à l'intégrine $\beta 1$, confirmant l'association du variant $\alpha 6A$ avec la sous-unité $\beta 4$. L'ensemble de ces résultats confirme qu'en plus de n'avoir aucune altération de l'expression du variant $\alpha 6B$, l'abolition du variant $\alpha 6A$ dans les cellules de cancer colorectal humain n'affecte pas la localisation membranaire du variant $\alpha 6B$.

3.4 Le variant $\alpha 6A$ régule la prolifération cellulaire

Certaines études ont révélé que la sous-unité intégrine $\alpha 6$ était impliquée dans la prolifération cellulaire (Lathia *et al.*, 2010; Y. Wang *et al.*, 2011). Par contre, aucune étude n'a analysé si cette fonction pouvait être attribuée à un de ses variants en particulier. Toutefois, nous avons précédemment démontré que la surexpression du variant $\alpha 6A$ augmente l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. La voie Wnt/ β -caténine est un puissant régulateur de la prolifération cellulaire (Polakis, 2012), suggérant que la fonction proliférative de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ pourrait être associée à son variant $\alpha 6A$ (Dydensborg *et al.*, 2009a). Pour confirmer cette hypothèse, l'implication du variant $\alpha 6A$ dans la croissance des cellules cancéreuses a d'abord été évaluée *in vitro* en établissant une courbe de croissance de cellules de cancer colorectal dans lesquelles l'expression du variant $\alpha 6A$ a été abolie, mais exprimant le variant $\alpha 6B$. Les expériences ont révélé une réduction significative du nombre de cellules tout au long des cultures (de 2 à 6 jours), et ce, dès 2 jours après l'ensemencement pour les cellules T84, HT29 et DLD-1 sh $\alpha 6A$ comparativement aux cellules shctrl. Dans le cas des cellules Caco-2/15, une réduction du nombre de cellules est observée 4 jours après l'ensemencement et maintenue à 6 jours comparativement aux cellules shctrl (Figure 10A). Dans l'ensemble, la suppression du variant $\alpha 6A$ conduit à une réduction significative et soutenue du taux de croissance de toutes les cellules de lignées de cancer colorectal humain testées.

Pour confirmer que la diminution de la croissance cellulaire est le résultat d'une réduction spécifique de la prolifération cellulaire et non d'une augmentation de l'apoptose, toutes les populations cellulaires de cancer colorectal exprimant de façon stable le sh $\alpha 6A$ ou le shctrl ont été soumises à des essais d'incorporation de BrdU et des essais ISEL. Pour toutes les cellules testées, l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ est accompagnée d'une

réduction significative du nombre de cellules qui entrent dans la phase S, comme le montrent les expériences d'incorporation du BrdU (Figure 10B). En même temps, les essais ISEL démontrent que les cellules de cancer colorectal utilisées possèdent de faibles niveaux d'apoptose et que la perte du variant $\alpha 6A$ ne les augmente pas (Figure 10C), établissant le rôle pro-prolifératif du variant $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal humain.

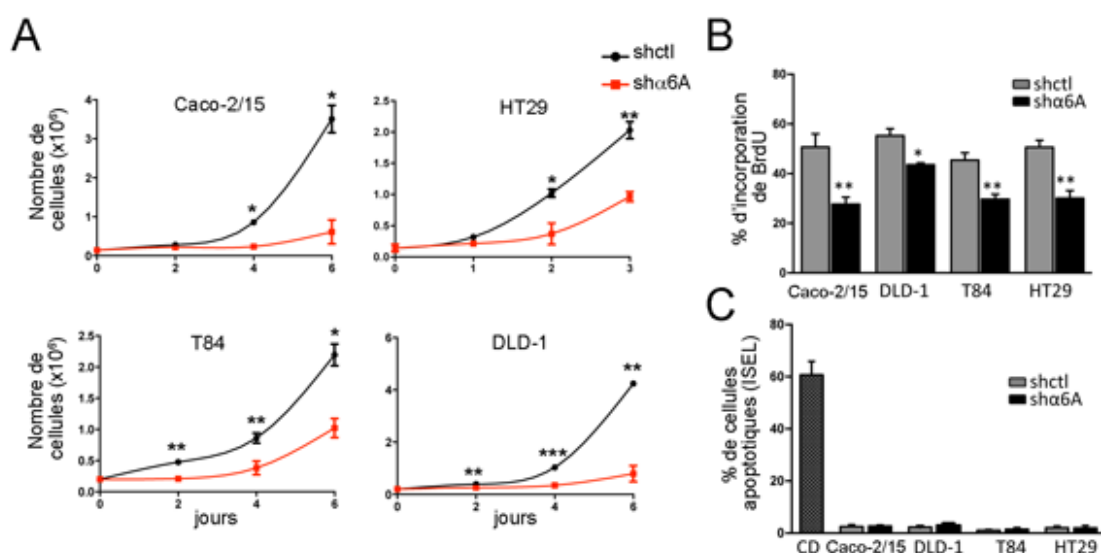


Figure 10 : Régulation de la prolifération des lignées d'adénocarcinome colorectal par le variant $\alpha 6A$. (A) Courbes de croissance cellulaire sur une période de 2 à 6 jours après l'ensemencement des populations de cellules Caco-2/15, DLD-1, T84 et HT29 exprimant de façon stable le sh $\alpha 6A$ ou shctrl. Les cellules ont été dénombrées aux temps indiqués. N=3. (B) Expériences d'incorporation de BrdU réalisées dans les lignées de cellules Caco-2/15, DLD-1, T84 et HT29 sh $\alpha 6A$ et shctrl. N=3. (C) Analyses de l'index apoptotique des cellules par expérience ISEL. Un contrôle positif d'apoptose a été effectué en ajoutant une concentration de 1 μ M de cytochalasine D (CD). Test t de student (shctrl vs sh $\alpha 6A$), *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001. N=3. Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

3.5 La suppression de l'expression du variant $\alpha 6A$ réduit la formation de tumeur en xénogreffes

La capacité des cellules n'exprimant pas le variant $\alpha 6A$ de former des tumeurs *in vivo* a été ensuite évaluée par l'injection sous-cutanée des cellules T84, HT29 et DLD-1 shctrl et sh $\alpha 6A$ chez des souris femelles immunodéficientes de souche nu/nu. Les cellules Caco2/15 ont été exclues pour cette analyse en raison de leur longue période de latence nécessaire pour observer la formation de tumeurs chez la souris. Les résultats ont démontré que la période de latence pour la détection de tumeurs palpables suite à l'injection sous-cutanée est retardée de façon significative pour les cellules T84 sh $\alpha 6A$ comparativement aux cellules T84 shctrl (respectivement 36 jours et 12 jours) (Figure 11A), mais pas pour les cellules HT29 et DLD-1. Néanmoins, la suppression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules T84 et HT29 diminue leur capacité à produire des tumeurs chez la souris (Figure 11A-B), entraînant une réduction significative du volume et du poids de la tumeur au moment de l'euthanasie des souris (Figure 11D-E). Toutefois, la diminution du taux de prolifération observée dans les cellules DLD-1 sh $\alpha 6A$ *in vitro* n'a pas eu pour corolaire une réduction significative de la croissance tumorale et du poids des tumeurs *in vivo* (Figure 11C, F). Les analyses histologiques effectuées après une coloration à l'hématoxyline et l'éosine ont montré une présence accrue de nécrose et d'œdème dans les xénogreffes des cellules DLD-1 shctrl, une observation peu présente avec les cellules DLD-1 sh $\alpha 6A$. Cela pourrait expliquer l'absence de différence dans le développement des tumeurs, malgré la diminution de la prolifération des cellules DLD sh $\alpha 6A$ *in vitro* (Figure 11G). Parallèlement, aucune différence histologique n'est observée entre les tumeurs issues des cellules T84 et HT9 shctrl et sh $\alpha 6A$ (Figure 11G). L'analyse de l'expression du variant $\alpha 6A$ suivant la fin du suivi des xénogreffes, a révélé que les tumeurs issues des cellules T84 sh $\alpha 6A$ expriment à nouveau le variant $\alpha 6A$, alors que l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ est maintenue dans les tumeurs issues des cellules HT29 et DLD-1 sh $\alpha 6A$. Malgré cette réapparition du variant $\alpha 6A$ dans les tumeurs issues des cellules T84 sh $\alpha 6A$, possiblement causées par l'absence d'agent de sélection *in vivo*, l'abolition initiale de l'expression variant $\alpha 6A$ a été suffisante pour ralentir le développement de tumeur comparativement aux cellules T84 shctrl (Figure 11 H). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le variant $\alpha 6A$ régule la

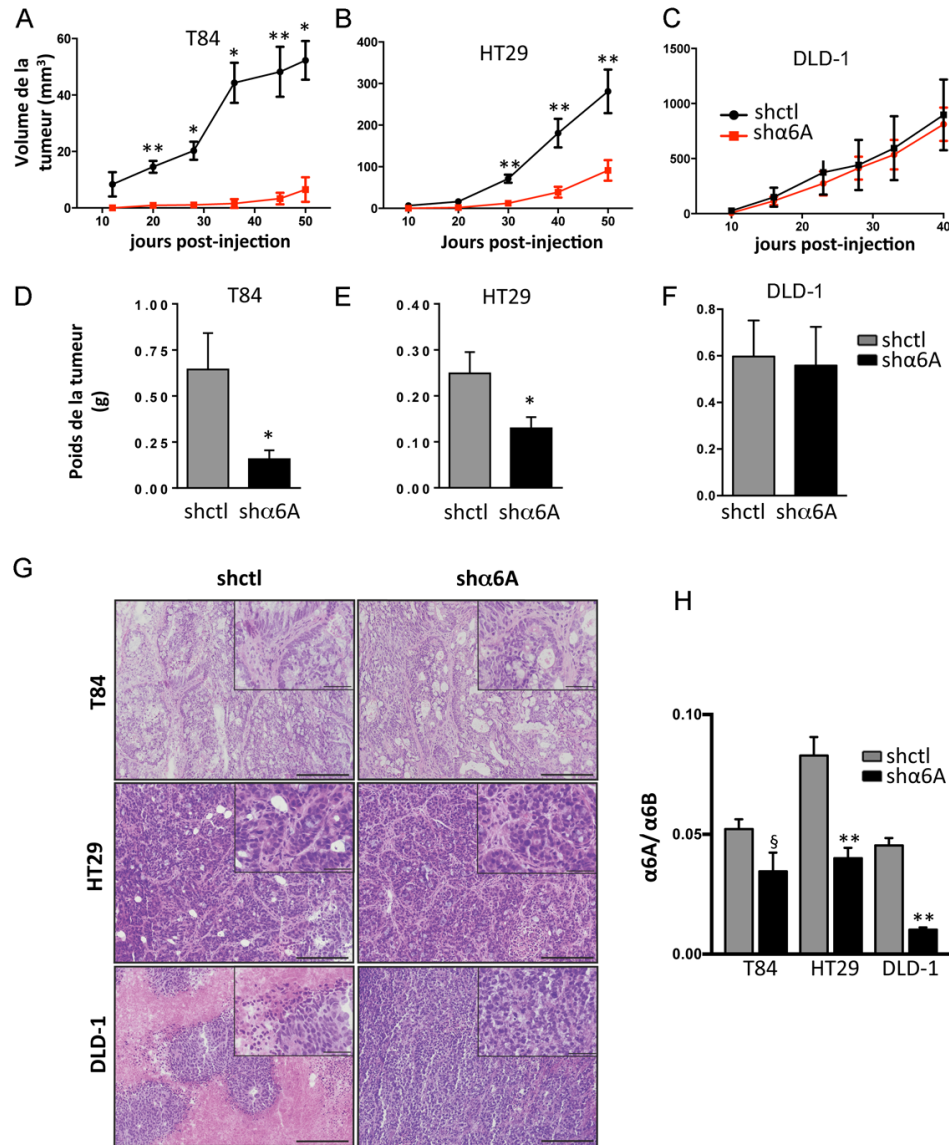


Figure 11 : L'abolition de l'expression du variant α6A dans les lignées de cellules de cancer colorectal réduit le développement de tumeur en xénogreffe. (A-C) Graphiques du volume tumoral des xénogreffes des cellules T84, HT29 et DLD-1 shctrl et shα6A, injectées en sous-cutané chez la souris immunodéficiente. Le volume de la tumeur (mm³) est déterminé en prenant deux mesures externes de la tumeur ($V = (d^2 \times D)/2$). (D-F) Poids (g) tumoral des xénogreffes des cellules T84, HT29 et DLD-1 shctrl et shα6A au moment du sacrifice des souris (40 à 50 jours après l'injection). Test t de student (shctrl vs shα6A), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. N=4. (G) Images représentatives de la coloration à l'hématoxyline et l'éosine des xénogreffes de tumeurs issues des cellules T84, HT29 et DLD-1 shctrl et shα6A. Échelles = 200 μm, insert=50 μm. N=4 (H) Analyses en PCR quantitative de l'expression des transcrits des variants α6A et α6B dans les xénogreffes des tumeurs issues des cellules T84, HT29 et DLD-1 shctrl et shα6A. Les données sont exprimées par le ratio α6A sur α6B. Test t de student (shctrl vs shα6A), ** $p \leq 0.01$, § $p = 0.0783$. N=3. Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

croissance tumorale au moins dans un sous-ensemble de lignées de cellules de cancer colorectal en xénogreffe.

3.6 La régulation de la voie Wnt/ β -caténine par le variant $\alpha 6A$

La voie β -caténine est l'un des régulateurs les plus importants de la prolifération cellulaire de plusieurs types cellulaires et est souvent fortement activée dans le cancer colorectal humain (Polakis, 2012). Le fait que l'abolition du variant $\alpha 6A$ affecte la prolifération cellulaire dans toutes les lignées cellulaires testées *in vitro*, suggère un lien possible entre l'expression du variant $\alpha 6A$ et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer colorectal humain. Afin d'évaluer l'impact de la suppression de l'expression du variant $\alpha 6A$ sur l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (objectif 3), les niveaux de phosphorylation sur la serine 37 et la thréonine 41 de la β -caténine effectuée par la GSK3 β ont d'abord été évalués en utilisant un anticorps reconnaissant la β -caténine active (soit déphosphorylée en Ser37 et Thr41). Les analyses par immunobuvardage des lysats cellulaires totaux ont d'abord montré que l'abolition du variant $\alpha 6A$ provoque une diminution significative des niveaux de β -caténine active par rapport à la β -caténine totale dans toutes les lignées cellulaires sh $\alpha 6A$ vs shctrl (Figure 12A). Conséquemment, l'analyse des extraits nucléaires a montré que cette diminution de la β -caténine active est accompagnée d'une réduction de la β -caténine nucléaire dans les cellules des lignées Caco-2/15, DLD- 1 et T84 sh $\alpha 6A$ comparativement aux shctrl, mais pas dans la lignée HT29 (Figure 12B). Ces résultats suggèrent que dans ces cellules de cancer colorectal, l'abolition du variant $\alpha 6A$ interfère avec l'activation de la voie Wnt/ β -caténine par l'augmentation de la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β , entraînant sa dégradation par le protéasome et conséquemment diminuant son accumulation au noyau. Pour confirmer l'importance fonctionnelle de la réduction de la β -caténine nucléaire, son activité transcriptionnelle a été analysée par des essais luciférase en utilisant un plasmide rapporteur Luciférase sous le contrôle de la liaison de la β -caténine avec ses cofacteurs TCF4/LEF1 (TOPflash). Les analyses ont permis d'observer que la réduction de la β -caténine nucléaire entraîne une diminution de l'activité du plasmide rapporteur TOPflash dans Caco-2/15, DLD- 1 et les cellules T84

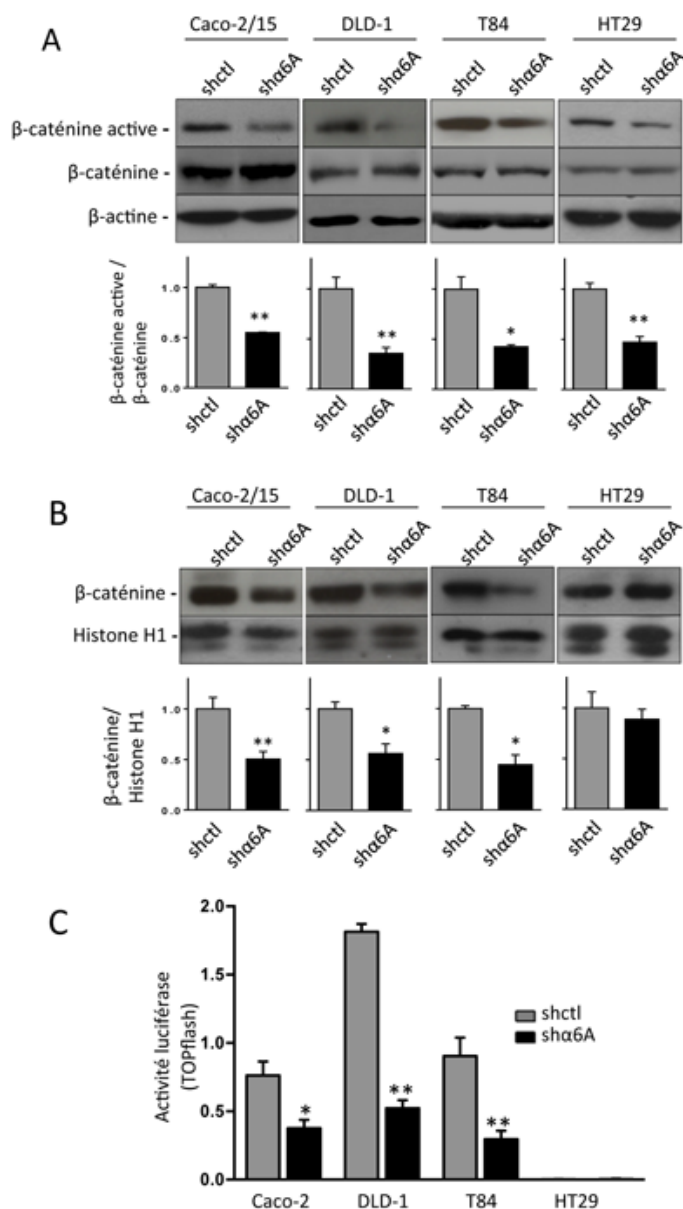


Figure 12 : Régulation de la voie Wnt/β-caténine par le variant α6A. (A-B) Immunobuvardages représentatifs et graphiques de l'analyse densiométrique pour la détection de la β-caténine active et la β-caténine totale dans des extraits cellulaires totaux (A) et la β-caténine totale dans des extraits nucléaires (B) des cellules shctl et sha6A des lignées Caco-2/15, DLD-1, T84 et HT29. La β-actine est utilisée comme contrôle de quantité protéique dans les extraits cellulaires entiers et l'histone H1 pour les extraits nucléaires. Test t de student (shctl vs sha6A), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. N=3. (C) Essais luciférase avec le promoteur répondant à la β-caténine/TCF4 (TOPflash) dans les cellules shctl et sha6A. Les résultats sont exprimés selon le ratio net de l'activité luciférase firefly par rapport à celui de la luciférase renilla du promoteur TOPflash – le promoteur FOPflash). Test t de student (shctl vs sha6A), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, N = 3. Adapté de (Groulx et al., 2014).

(Figure 12C). L'activité luciférase TOPflash n'est pas différente entre les cellules HT29 shctrl et sh α 6A. Toutefois, dans nos expériences, les cellules HT29 ont de très faibles niveaux d'activation du plasmide rapporteur (TOPflash) par rapport aux autres lignées cellulaires. Ces résultats montrent que l'abolition du variant α 6A dans les cellules de cancer colorectal affecte l'activité de la Wnt/ β -caténine par le contrôle de la forme active de la β -caténine. Conséquemment, le variant α 6A semble impliquée dans l'activation de la β -caténine en prévenant sa phosphorylation par la GSK β .

3.7 L'inhibition de la GSK3 β rétablit la voie Wnt/ β -caténine

Pour approfondir la contribution de la GSK3 β dans la régulation de la voie Wnt/ β -caténine par le variant α 6A, l'impact de l'inhibition de la GSK3 β sur le rétablissement de l'activité du plasmide rapporteur TOPflash ainsi que sur l'expression des gènes cibles de la β -caténine a été analysé dans les cellules T84 shctrl et sh α 6A. D'une part, les essais luciférase ont démontré que l'inhibition pharmacologique de la GSK3 β conduit à une stimulation significative de l'activité luciférase du plasmide rapporteur TOPflash, à la fois dans les cellules shctrl et sh α 6A (Figure 13A). De plus, l'inhibition de la GSK3 β stimule l'activité luciférase du plasmide TOPflash à un même niveau dans les cellules shctrl et sh α 6A. Ces observations suggèrent un rétablissement de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine par l'inhibition de la GSK3 β dans les cellules dans lesquelles l'expression du variant α 6A a été abolie. Pour étendre ces observations dans un contexte physiologique, l'impact de l'abolition de l'expression du variant α 6A et de l'inhibition de la GSK3 β sur l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine a été évalué en PCR quantitative. Pour ce faire, les gènes *LGR5*, *CCND1*, *CCND2* et *MYC*, quatre gènes cibles bien documentés de la voie Wnt/ β -caténine dans l'intestin, ont été choisis pour les analyses (Cole *et al.*, 2010; He *et al.*, 1998; Schuijers et Clevers, 2012; Tetsu et McCormick, 1999). Les résultats ont montré que l'abolition de l'expression du variant α 6A provoque une réduction significative de l'expression des transcrits de *LGR5* et de *CCND2* (Figure 13B-C), confirmant l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine. De plus, l'inhibition de la GSK3 β dans les cellules sh α 6A entraîne une stimulation significative de l'expression de ces deux gènes (Figure 13B-C). Toutefois, lorsque les cellules shctrl et sh α 6A traitées avec

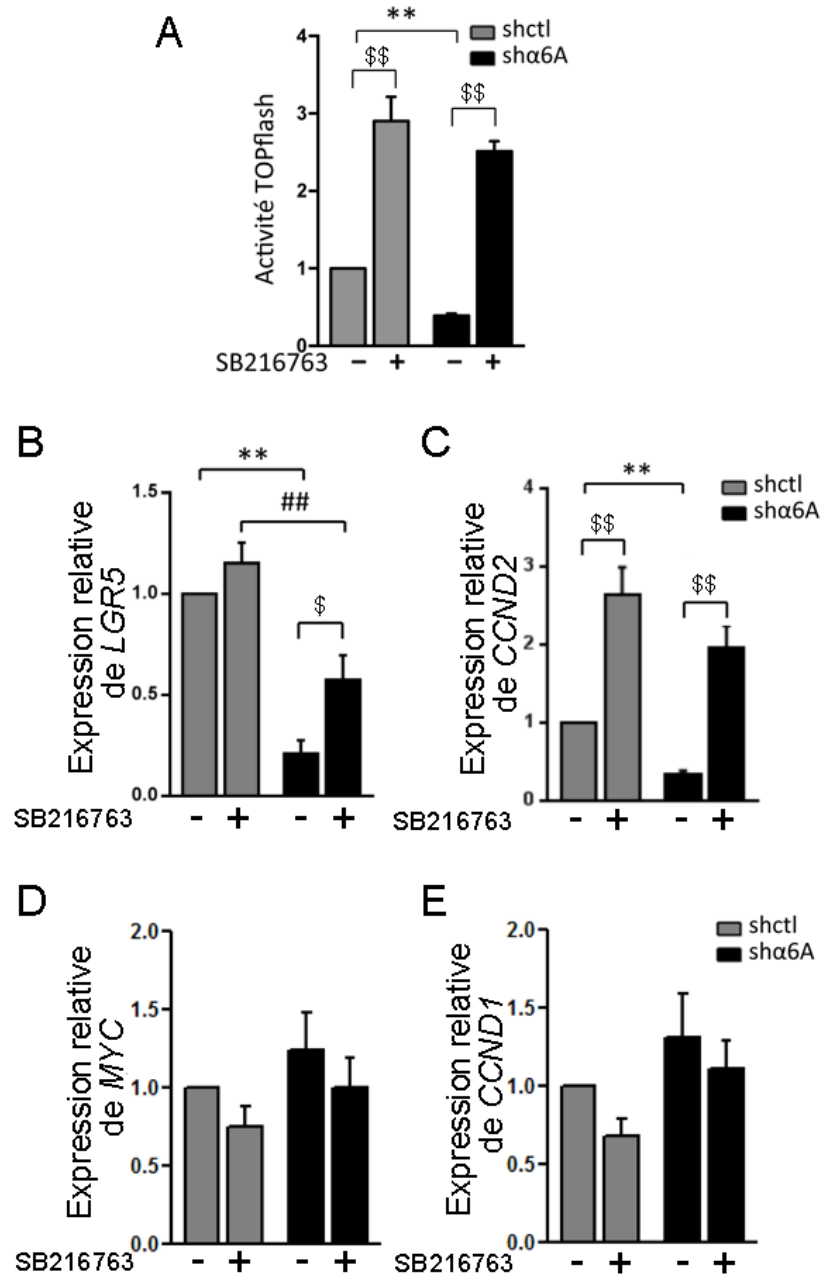


Figure 13. L'inhibition de la GSK3 β rétablit l'activité de la voie Wnt/ β -caténine. (A) Essais luciférase (TOPflash) avec le promoteur répondant à la β -caténine/TCF4 dans les cellules T84 shctrl et sh α 6A traitées avec le SB216763 (un inhibiteur pharmacologique de la GSK3 β). Test statistique ANOVA : shctrl vs sh α 6A : ** $p \leq 0.001$, - vs + SB216763 : \$\$ $p \leq 0.001$. N=3. (B-E) Analyses en PCR quantitative de l'expression des transcrits de *LGR5* (B), *CCND2* (C), *CCND1* (D) et *MYC* (E) dans les cellules T84 shctrl et sh α 6A traitées pendant 24 h avec le SB216763. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence *RPLPO*. Test statistique ANOVA; shctrl vs sh α 6A : ** $p \leq 0.001$; shctrl vs sh α 6A + SB216763 : ## $p \leq 0.001$; - vs + SB216763 : \$ $p \leq 0.05$, \$\$ $p \leq 0.001$. N =3. Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

l'inhibiteur GSK3 β sont comparées, l'expression de *LGR5* est encore nettement plus faible dans les cellules sh α 6A que dans les cellules shctrl, tandis que l'expression de *CCND2* est similaire (Figure 13B-C). Cette observation suggère au moins une restauration au moins partielle de l'expression de LGR5 par l'inhibition de la GSK3 β . Contre toute attente, aucune modulation significative de l'expression des transcrits de la *CCND1* et de *MYC* n'a été constatée dans ces expériences (Figure 13D-E). De tels résultats démontrent que le variant α 6A contrôle l'activation de la voie Wnt/ β -caténine et l'expression de certains de ses gènes cibles par le biais de GSK3 β . Compte tenu du rôle majeur de la voie Wnt/ β -caténine dans la prolifération cellulaire, il est possible que le variant α 6A affecte la régulation de la prolifération des cellules de cancer colorectal humain par cette voie.

3.8 La régulation des niveaux protéiques de DVL2 par le variant α 6A

L'impact de l'abolition de l'expression du variant α 6A sur l'expression de la forme active et nucléaire de la β -caténine, combiné au fait que l'inhibition de la GSK3 β rétablit l'activité de la voie Wnt/ β -caténine, suggèrent que le variant α 6A interfère avec un événement de signalisation en amont de la GSK3 β . Cette hypothèse a mené à étudier la possibilité que le variant α 6A puisse réguler le régulateur principal de la GSK3 β , la protéine DVL2. Tel que mentionné précédemment, la protéine DVL2 permet l'activation de la voie Wnt/ β -caténine le complexe de destructions et ainsi l'activation de la GSK3 β , empêchant ainsi la β -caténine d'être phosphorylée et dégradée (Angers et Moon, 2009). Les analyses par immunobuvardage des lysats cellulaires totaux provenant des lignées Caco-2/15, DLD-1, T84 et HT29 ont révélé que l'abolition de l'expression du variant α 6A entraîne une diminution significative de DVL2 dans toutes les lignées cellulaires testées comparativement aux cellules shctrl (Figure 14A). Toutefois, cette diminution de la protéine n'est pas précédée d'une baisse des transcrits de DVL2, suggérant un effet post-traductionnel avec régulation de la stabilité de la protéine par le variant α 6A (Figure 14B).

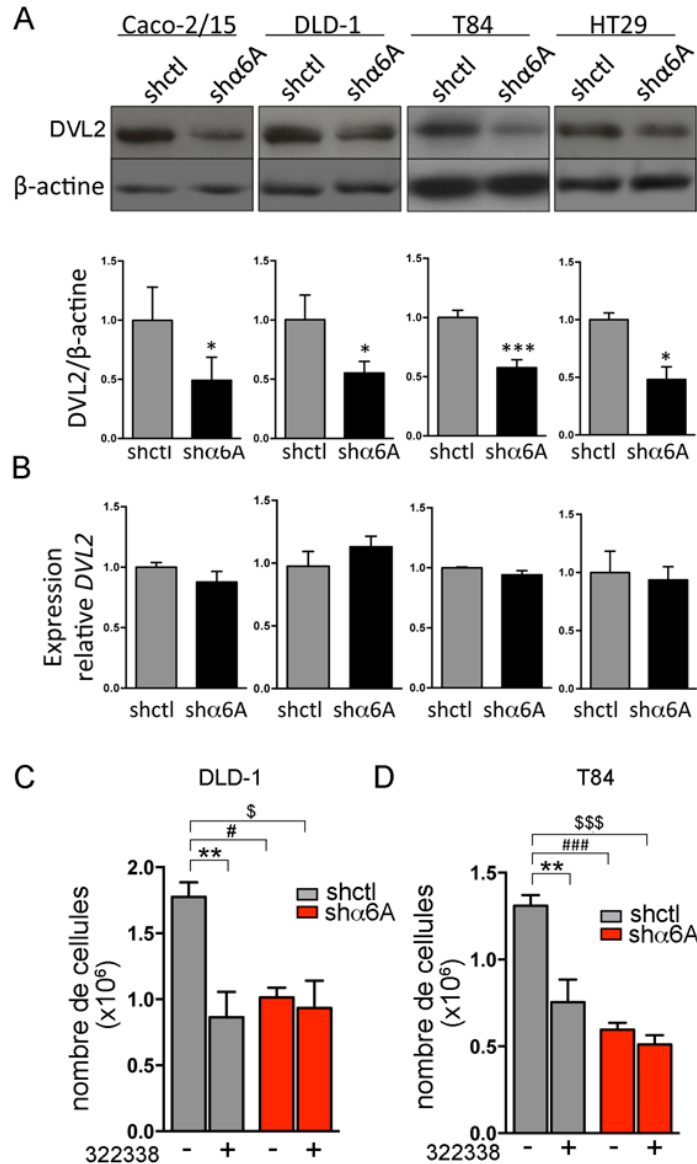


Figure 14 : L'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ régule la protéine DVL2. (A) Immunobuvardages représentatifs et les graphiques de densimétrie correspondant à la détection de DVL2 dans les cellules shctl et sha6A dans 4 lignées (Caco-2/15, DLD-1, T84 et HT29) après à 4 jours d'ensemencement. Test t de student apparié, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.0001$. $n = 3$. (B) Analyses en PCR quantitative de l'expression du transcrit de *DVL2* dans les cellules shctl et sha6A après 4 jours d'ensemencement. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence *RPLPO*. Test t de student apparié. $n=3$. (C-D) L'inhibition de DVL régule négativement la croissance cellulaire. Graphiques représentant le nombre de cellules suite à l'ajout du DMSO ou de l'inhibiteur pharmacologique de DVL (322338) pendant 48h dans les cellules DLD-1 (C) et T84 (D) Les cellules ont été cultivées 24h avant les traitements. Analyse statistique ANOVA shctl +DMSO vs shctl + 322338 : ** $p \leq 0.001$. Test statistique ANOVA; shctl + DMSO vs sha6A + DMSO : # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.0001$; shctl + DMSO vs sha6A + 322338 : \$ $p \leq 0.05$, \$\$\$ $p \leq 0.0001$. $N= 3$. Adapté de (Groulx *et al.*, 2014).

3.9 L'inhibition de DVL ralentit la croissance cellulaire

Pour confirmer l'importance fonctionnelle de la réduction de DVL2 suite à l'abolition du variant $\alpha 6A$, la croissance des cellules T84 et DLD-1 shctrl et sh $\alpha 6A$ a été analysée suite à un traitement avec un inhibiteur pharmacologique de DVL (322338). Cet inhibiteur empêche l'interaction entre DVL et le récepteur FRIZZLED en ciblant le domaine PDZ de DVL. Les analyses ont établi que l'inhibition de DVL dans les cellules T84 et DLD-1 shctrl après 24h de culture permet de réduire la croissance cellulaire, alors que l'ajout de l'inhibiteur de DVL dans les cellules T84 et DLD-1 sh $\alpha 6A$ n'entraîne aucun changement de la croissance cellulaire, et ce, après 48 heures de traitement (Figure 14C-D). Ce résultat indique l'importance biologique de la protéine DVL2 dans la croissance des cellules de cancer colorectal, en plus de confirmer que l'effet du variant $\alpha 6A$ sur la prolifération cellulaire est relié à la diminution des niveaux protéiques de DVL2.

3.10 La régulation de la dégradation autophagique de DVL2 par le variant $\alpha 6A$

Le fait que la protéine DVL2 est diminuée alors que son transcrit n'est pas affecté suite à la perte de l'expression du variant $\alpha 6A$, implique une régulation au niveau de la stabilité protéique. Une étude a récemment démontré que la protéine DVL2 pouvait être dégradée par le processus d'autophagie via son interaction avec la protéine adaptatrice p62 ou séquestosome 1 codée par le gène *SQSTM1* (Gao *et al.*, 2010). Conséquemment, l'implication de l'autophagie dans la dégradation de DVL2 et la régulation de la voie Wnt/ β -caténine par le variant $\alpha 6A$ a été étudiées dans les cellules de cancer colorectal humain T84. Pour ce faire, les niveaux de DVL2 et de β -caténine active ont été évalués suite à la stimulation de l'autophagie en inhibant l'activité du complexe mTOR avec la rapamycine et suite à l'inhibition de la dégradation autophagique avec la bafilomycine A1. Plus précisément, la bafilomycine A1 empêche la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, permettant l'accumulation des protéines habituellement dégradées par l'autophagie tel que la protéine adaptatrice et cargo p62. Tout d'abord, les analyses d'immunobuvardage ont révélé que la modulation de l'autophagie n'affecte pas les niveaux protéiques de DVL2 et de la β -caténine active dans les cellules T84 shctrl (Figure 15A).

Toutefois, la stimulation de l'autophagie dans les cellules $\text{sh}\alpha 6\text{A}$ engendre une diminution des niveaux protéiques de DVL2 accompagnée d'une réduction de la β -caténine active, comparativement aux mêmes cellules traitées avec le DMSO. D'un autre côté, l'inhibition de la dégradation autophagique entraîne une augmentation des niveaux protéiques de DVL2 sans pour autant rétablir les niveaux de β -caténine active (Figure 15A). Parallèlement, l'inhibition de la dégradation autophagique est validée par l'accumulation de la forme autophagique de LC3-II et de p62, alors que la stimulation de l'autophagie n'affecte pas les niveaux de LC3-II. Toutefois, la réduction de la phosphorylation sur la Thr389 de la protéine S6K, qui est un substrat de mTORC1, démontre que la voie mTORC1 est inhibée. mTORC1 est un régulateur majeur de l'induction de l'autophagie (Nicklin *et al.*, 2009), on peut donc supposer indirectement, que l'autophagie a été stimulée par la rapamycine

Pour valider ces résultats, la localisation de DVL2 dans l'autophagosome fut investiguée. Une immunofluorescence a été effectuée pour la détection de DVL et de P62 dans les cellules T84 shctrl et $\text{sh}\alpha 6\text{A}$ dans lesquelles la dégradation autophagique est inhibée avec la bafilomycine A1. Conséquemment aux résultats précédents, l'inhibition de la dégradation autophagique engendre une faible colocalisation de DVL avec P62 dans les cellules T84 shctrl . Dans les mêmes conditions, une forte colocalisation de DVL avec P62 est observée dans les cellules T84 $\text{sh}\alpha 6\text{A}$ (Figure 15B). Ces résultats démontrent que l'absence du variant $\alpha 6\text{A}$ pourrait favoriser la dégradation de la protéine DVL2 par l'autophagie en augmentant sa liaison à p62 via son ubiquitination. Dans le but de caractériser le mécanisme favorisant la dégradation de DVL2 par le variant $\alpha 6\text{A}$, l'expression de VHL et PRICKLE1, deux protéines précédemment identifiées pour réguler l'ubiquitination et la dégradation de DVL ont été étudiées (Chan *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). Les analyses en PCR quantitative ont révélé que l'abolition du variant $\alpha 6\text{A}$ est accompagnée d'une augmentation de l'expression du transcrit de PRICKLE1, mais pas de VHL (Figure 15C). Cette augmentation est confirmée au niveau protéique par les analyses en immunobuvardage (Figure 15D). Ces résultats mettent en évidence un mécanisme contrôlé spécifiquement par le variant $\alpha 6\text{A}$ pour réguler la voie Wnt/ β -caténine, et ce, par l'intermédiaire de la dégradation autophagique de la protéine DVL2 et possiblement impliquant PRICKLE1.

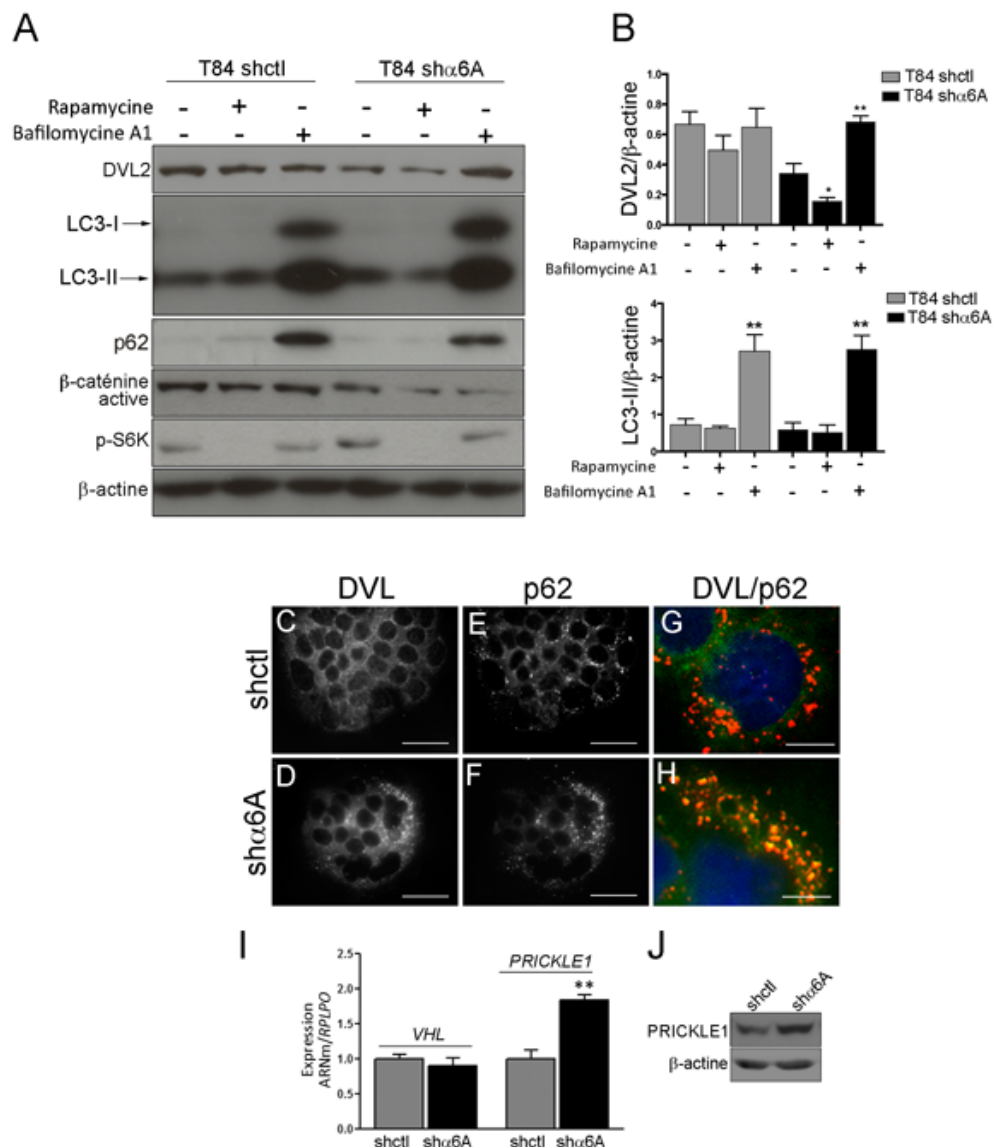


Figure 15 : Régulation de la dégradation autophagique de DVL par le variant α 6A.

(A) Immunobuvardages représentatifs pour la détection de DVL2 et de la β -caténine active dans les cellules T84 shctl et sh α 6A suite au traitement 24 h avec la rapamycine et la bafilomycine A1. Les protéines LC3-II et P62 confirment l'inhibition de l'autophagie et la détection de p-s6K confirme l'inhibition de mTOR1. (B) Graphiques de l'analyse densitométrique de LC3-II et DVL2. Analyse statistique ANOVA (vs DMSO), * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$. N=3. (C-H) Images représentatives d'immunofluorescence pour la localisation DVL (C,D), de p62 (E,F) et la colocalisation de DVL (vert), de p62 (rouge) et le DAPI (bleu) dans les cellules T84 shctl (C,E,G) et T84 sh α 6A (D,F,H) traitées à la bafilomycine A1 pendant 24 h. N=3. Échelle : C-F = 50 μ m; G-H = 12.5 μ m. (I) Analyses en PCR quantitative de l'expression du transcrite de *VHL* et de *PRICKLE1* dans les T84 shctl et sh α 6A. Analyse statistique Test t de student (shctl vs sh α 6A) : ** $p \leq 0.001$. N= 3. (J) Immunobuvardage représentatif pour la détection de PRICKLE1 dans les T84 shctl et sh α 6A. La β -actine est utilisée comme contrôle de quantité de protéines. N=3.

3.11 La corrélation entre l'expression de *MYC* et le variant $\alpha 6A$ *in vitro*

Les résultats obtenus dans la première partie de mes travaux de recherche ont permis de prouver que la sous-unité $\alpha 6$ est surexprimée sous la forme du variant $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal (objectif 1), que le variant $\alpha 6A$ régule la prolifération et la tumorigenèse (objectif 2) ainsi que la voie Wnt/ β -caténine par la dégradation autophagique de DVL2 (objectif 3). Toutefois, le mécanisme contrôlant son expression dans le cancer colorectal humain est toujours inconnu. En ce sens, la seconde partie de mes travaux consistait à déterminer si *MYC* est impliquée dans l'expression du variant $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal humain (objectif 4). Plusieurs évidences suggèrent que *MYC* est impliqué dans l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ (Gebhardt *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 1997), mais son rôle exact dans l'expression du variant $\alpha 6A$ n'est pas encore établi. Afin d'établir une éventuelle cause à effet, l'expression de *MYC*, de la sous-unité $\alpha 6$ et de ses variant $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ a tout d'abord été analysée dans différentes lignées cellulaires de cancer colorectal couramment étudiées (T84, DLD-1, Caco-2/15, HT29, HCT116, SW480, SW620) et comparées à un modèle de cellules épithéliales intestinales normales (HIEC). Les analyses en PCR quantitatives ont révélé que les lignées cellulaires de cancer colorectal expriment des niveaux élevés du transcrit de *MYC* (Figure 16A) et de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ (Figure 16B) par rapport aux cellules HIEC, suggérant une lien. Cependant, l'analyse subséquente en PCR compétitive a mis en évidence que la majorité des lignées cellulaires de cancer colorectal et les HIEC expriment majoritairement le transcrit du variant $\alpha 6A$ comparativement au variant $\alpha 6B$, à l'exception de DLD-1 et SW620 (Figure 16C). Le modèle cellulaire Caco-2/15 de différenciation d'entérocytes se caractérise par une expression différente du variant $\alpha 6A$ du variant $\alpha 6B$ lors de l'atteinte de la confluence (Dydenborg *et al.*, 2009a). L'analyse par immunobuvardage des niveaux protéiques de *MYC* dans ce modèle a révélé que l'expression de la protéine *MYC* décroît avec la différenciation des Caco-2/15 et corrèle avec la diminution du variant $\alpha 6A$ et l'augmentation du variant $\alpha 6B$ (Figure 16D). Ces résultats mettent en lumière une possible régulation de l'expression du variant $\alpha 6A$ par *MYC*.

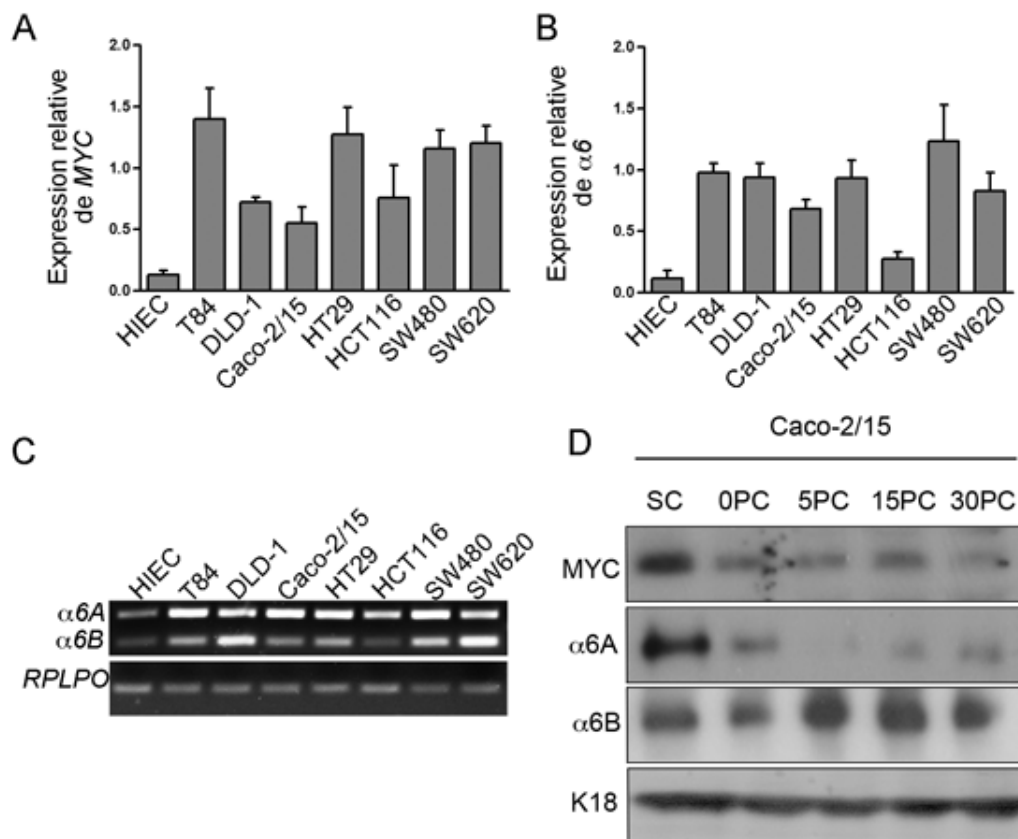


Figure 16 : Corrélation *in vitro* entre l'expression de MYC et le variant $\alpha 6A$. Analyses en PCR quantitative des transcrits de *MYC* (A) et de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ (B) dans différentes lignées cellulaires de cancer colorectal et dans la lignée intestinale épithéliale normale HIEC. (C) Analyses en PCR compétitive de l'expression des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence *RPLPO*. N=3. (D) Immunobuvardages représentatifs pour la détection des niveaux protéiques de MYC, $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ dans le modèle de différenciation entérocytaire Caco-2/15. L'expression de la cytokératine 18 (K18) est utilisée comme contrôle de quantité de protéines. N=3.

3.12 La corrélation entre l'expression de *MYC* et de la sous-unité *α6A* *in vivo*

Dans une tentative de confirmer cette corrélation *in vivo*, l'expression du gène de la sous-unité intégrine *α6* et celle de son variant *α6A* ont été comparées avec l'expression de *MYC* dans 20 tumeurs colorectales humaines avec leur marge de résection correspondante. Tel que décrite dans des études antérieures, l'expression de *MYC* est augmentée dans les 20 tumeurs de cancer colorectal en comparaison avec leur marge de résection. Lorsque les données sont comparées avec celles de l'expression du transcrit de la sous-unité *α6*, une forte corrélation positive entre leur expression est constatée ($p \leq 0.0001$, Pearson $r = 0.8374$) (Figure 17A). Cette observation supporte un contrôle de *MYC* sur l'activation du promoteur du gène de la sous-unité *α6* dans le cancer colorectal. Lorsque les données de l'expression de *MYC* sont comparées avec celles de l'expression du variant *α6A*, une forte corrélation positive a également est observée ($p \leq 0.0001$, Pearson $r = 0.776$) (Figure 17B). Cette observation suggère une implication de *MYC* cette fois dans l'expression spécifique du variant *α6A* dans les cancers colorectaux humains.

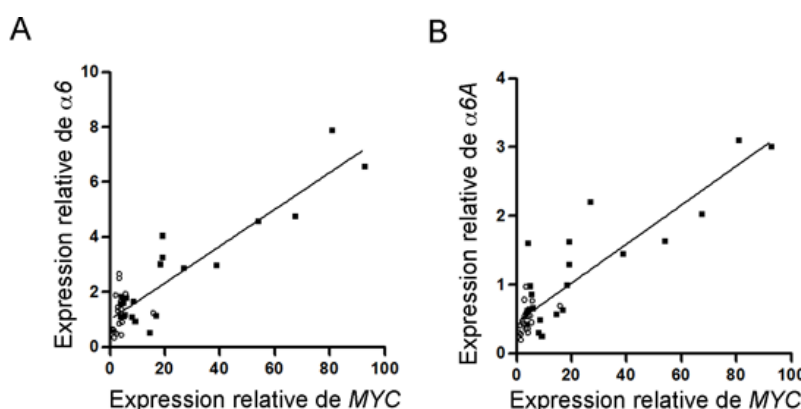


Figure 17 : Corrélation entre l'expression de *MYC* et *α6A* dans les tumeurs primaires colorectales humaines. Graphique démontrant la corrélation de l'expression du transcrits de *MYC* avec le transcrit de la sous-unité intégrine *α6* (A) et de son variant *α6A* (B) dans 20 tumeurs primaires colorectales avec leur marge de résection correspondante. Corrélation entre *MYC* et la sous-unité *α6* : Corrélation de Pearson $r = 0.934$, $p \leq 0.0001$. Corrélation entre *MYC* et le variant *α6A* : Corrélation de Pearson $r = 0.880$, $p \leq 0.0001$. Les cercles vides représentent l'expression dans les marges de résection (MR). Les carrés noirs représentent l'expression dans les tumeurs primaires colorectales (Tu). Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence *B2M*.

3.13 MYC régule le promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$

Le promoteur du gène de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ contient une séquence CACGAT reconnue par l'hétérodimère MYC/MAX, suggérant que MYC agit directement sur son promoteur pour réguler son expression (Nishida *et al.*, 1997). Dans le but de corroborer cette hypothèse, l'effet de la surexpression de MYC et d'un mutant dominant négatif MADMYC sur l'activation du promoteur du gène de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ a été analysé par essais luciférase. Pour se faire, un plasmide rapporteur exprimant la luciférase renilla sous le contrôle du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ a été utilisé. Dans un premier temps, les expériences d'essais luciférase ont révélé que dans la lignée cellulaire 293T, la surexpression de MYC entraîne une augmentation de l'activité du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$, tandis que la surexpression du mutant dominant négatif MADMYC vient contrecarrer l'effet exercé par MYC (Figure 18A). Pour étendre ces observations dans un contexte de cancer colorectal, les expériences d'essais luciférase ont été par la suite effectuées dans les lignées cellulaires T84, Caco-2/15 et SW620. Contrairement aux résultats observés avec les cellules 293T, la surexpression de MYC dans les cellules de cancer colorectal n'affecte pas l'activité du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$. Toutefois, la surexpression de MADMYC, à lui seul, permet de réduire significativement l'activité du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ (Figure 18B-D). Ce résultat prouve le rôle de MYC dans la régulation de l'activation du promoteur du gène la sous-unité intégrine $\alpha 6$, et ce, dans un contexte de cancer colorectal.

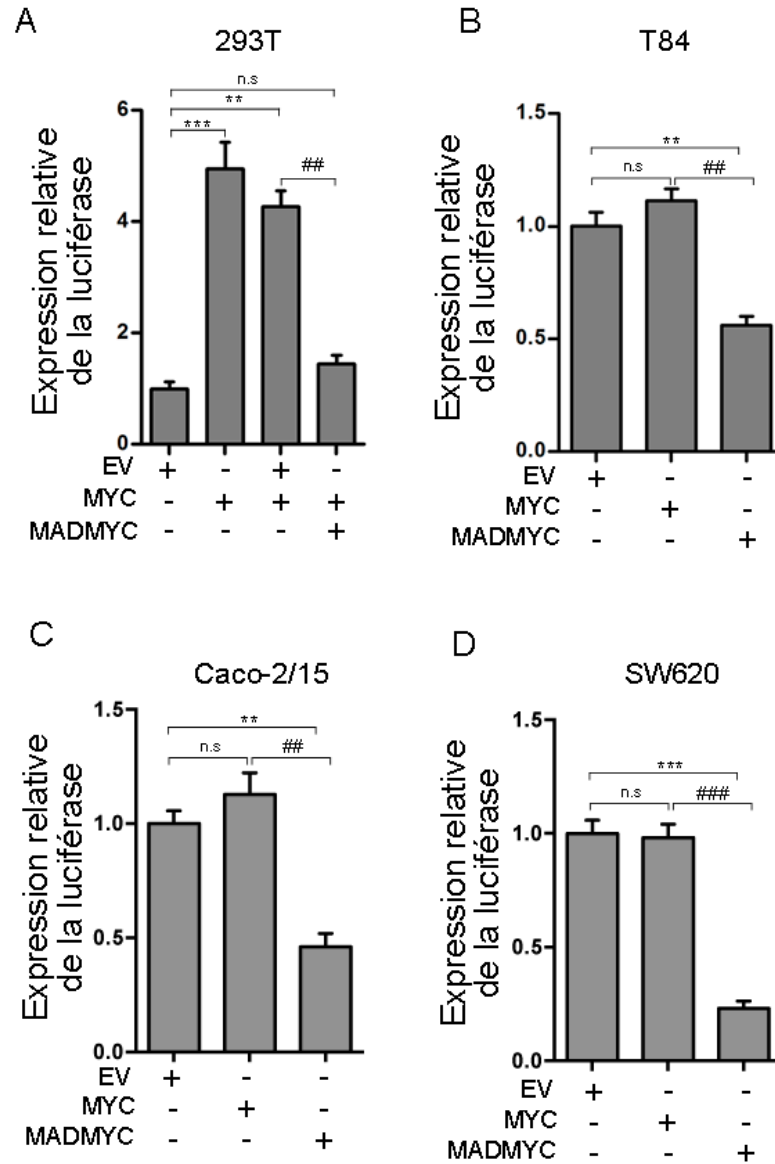


Figure 18 : MYC régule l'activité du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$. (A-D) Essais luciférase avec le promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ dans les cellules 293T (A), T84 (B), Caco-2/15 (C) et SW620 (D). Les cellules sont transfectées avec le plasmide vide (+EV), le plasmide exprimant MYC (+MYC) et le plasmide exprimant le mutant dominant négatif MADMYC (+MADMYC). Test statistique ANOVA vs +EV : *** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.001$. Test statistique ANOVA vs +MYC: ### $p \leq 0.0001$, ## $p \leq 0.001$. N=3.

3.14 L'inhibition pharmacologique de MYC réduit l'expression du variant $\alpha 6A$

Afin d'investiguer plus en profondeur la participation de MYC dans l'expression du variant $\alpha 6A$, les cellules T84 ont été traitées avec un inhibiteur pharmacologique de MYC (10058-F4). L'inhibiteur agit spécifiquement en brisant l'interaction MYC/MAX, empêchant ainsi la transactivation des gènes cibles. Les cellules sont traitées avec 50 μM et 100 μM d'inhibiteur pendant 24 h et 48 h et analysées en PCR quantitative pour l'expression des transcrits de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ et de ses variants. Dans un premier temps, l'inhibition de MYC avec 50 μM et 100 μM d'inhibiteur entraînent une réduction de l'expression du gène de la sous-unité $\alpha 6$ dès 24 h de traitement comparativement aux cellules contrôles traitées avec le DMSO. Cette réduction est, de plus, maintenue et plus importante à 48 h de traitement (Figure 19A). Conséquemment, dans les mêmes conditions de traitement, l'expression du variant $\alpha 6A$ est également diminuée. (Figure 19B). L'analyse subséquente de l'expression du transcrit du variant $\alpha 6B$ a permis de révéler que le traitement avec 50 μM et 100 μM d'inhibiteur de MYC pendant 24 h provoque une augmentation de son expression, alors qu'après 48 h d'inhibition, l'expression du variant $\alpha 6B$ est similaire aux cellules traitées avec le DMSO (Figure 19C). Dans le but de confirmer si ce changement de l'expression des transcrits se transpose dans un changement au niveau protéique, une analyse par immunobuvardage a été effectuée sur les cellules T84 traitées avec 50 μM et 100 μM d'inhibiteur de MYC pendant 48 h. Le traitement avec l'inhibiteur de MYC entraîne une réduction des niveaux protéiques de MYC, plus importante avec une concentration de 100 μM . Ce constat indique que lorsque MYC n'est pas lié à MAX, il est dégradé. D'autre part, les niveaux protéiques de la sous-unité $\alpha 6$ et de son variant $\alpha 6A$ sont diminués seulement lorsque les cellules sont traitées avec une concentration de 100 μM d'inhibiteur de MYC (Figure 19D). Néanmoins, les niveaux protéiques du variant $\alpha 6B$ sont augmentés avec des concentrations de 50 μM et 100 μM (Figure 19D). Ces résultats valident le rôle de MYC dans l'expression de la sous-unité $\alpha 6$, mais aussi dans l'épissage alternatif favorisant le variant $\alpha 6A$.

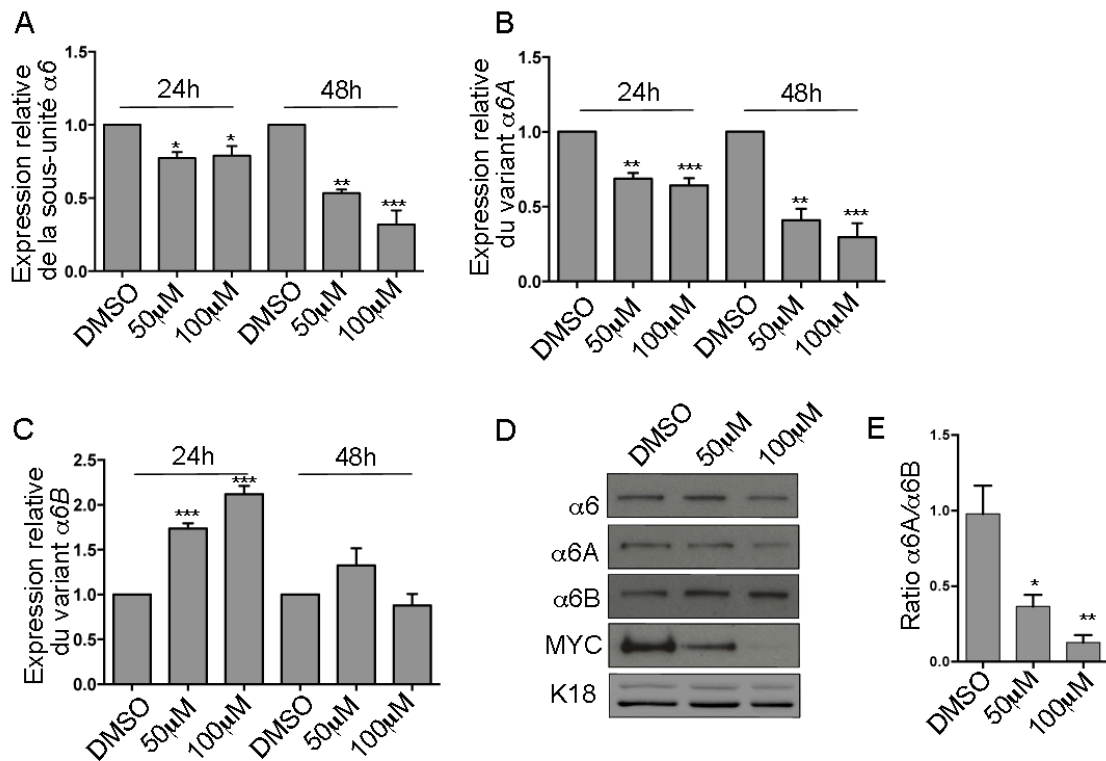


Figure 19 : L'inhibition pharmacologique de MYC régule l'épissage alternatif de la sous-unité intégrine $\alpha 6$. Analyses en PCR quantitative de l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ (A), ses variants $\alpha 6A$ (B) et $\alpha 6B$ (C). Les cellules T84 sont traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de MYC (10058-F4) à des concentrations de 50 μ M et 100 μ M pendant 24 h et 48 h. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence *RPLPO*. Test statistique ANOVA vs DMSO : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$. N=3. (D) Immunobuvardages représentatifs pour la détection des niveaux protéiques de MYC et des niveaux protéiques de la sous-unité $\alpha 6$ et de ses variants d'épissage alternatif $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ après 48 h de traitement avec l'inhibiteur de MYC. La cytokératine 18 (K18) est utilisée comme contrôle de quantité de protéines. (E) Graphiques de l'analyse densitométrique du ratio des niveaux protéiques des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ normalisé par la cytokératine 18. Test statistique ANOVA vs DMSO: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$. N=3.

3.15 La régulation de l'expression de facteurs d'épissage alternatif par MYC

Dans le but d'identifier par quel mécanisme MYC régule l'épissage alternatif de la sous-unité $\alpha 6$, l'expression de différents facteurs d'épissage activateur et répresseur a été analysée suite au traitement avec 100 μ M d'inhibition de MYC. Les gènes des facteurs d'épissage *HNRNPA1*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPH1*, *PTBPI*, *ESRP1* et *ESRP2* ont été choisis pour ces analyses et ce dans les cellules T84. Parmi les gènes choisis, seuls *HNRNPA2B1* et *ESRP2* sont retrouvés diminués après 24 h d'inhibition de MYC, alors que le gène *ESRP1* est significativement augmenté dans les mêmes conditions (Figure 20). Toutefois, l'analyse à 48h a révélé que la réduction de l'expression des transcrits de *HNRNPA2B1* et *ESRP2* est maintenue, alors que l'expression de *ESRP1* n'est pas significativement modulée. De plus, on observe après 48 h de traitement avec l'inhibiteur de MYC, une diminution significative de l'expression des transcrits de *HNRNPA1* et de *PTBPI* (Figure 20). Ces observations, couplées aux résultats précédents démontrant un changement d'épissage dès 24 h de traitement avec l'inhibiteur de MYC, permettent d'identifier deux facteurs d'épissages activateur et répresseur régulés par MYC possiblement impliqués dans l'épissage alternatif de la sous-unité $\alpha 6$, soit le facteur activateur *ESRP2* et le facteur répresseur *HNRNPA2B1*.

3.16 L'abolition de l'expression de *HNRNPA2B1* favorise l'expression du variant $\alpha 6A$

De ces deux candidats pour réguler l'épissage alternatif de l'exon 25 de la sous-unité $\alpha 6$, le facteur d'épissage activateur *ESRP2* serait impliqué dans l'épissage de la sous-unité $\alpha 6$ (Goel *et al.*, 2014). Conséquemment, la participation du facteur répresseur *HNRNPA2B1* a été étudié plus en profondeur dans les cellules T84. Pour ce faire, les cellules T84 ont été infectées avec trois différents shARN ciblant *HNRPA2B1* et un sh contrôle (shctrl). Les analyses d'immunobuvardage ont dans un premier temps confirmé la baisse de l'expression du facteur d'épissage *HNRNPA2B1* au niveau protéique dans les trois populations cellulaires infectées avec les différents sh*HNRPA2B1* par rapport aux cellules infectées avec le shctrl (Figure 21). Des trois shARN ciblant le facteur *HNRPA2B1*, le

shHNRNPA21B1-3 est le plus efficace. Les analyses subséquentes ont révélé que l'abolition du facteur d'épissage HNRNPAB1 entraîne une augmentation du variant $\alpha 6A$, accompagnée d'une diminution du variant $\alpha 6B$ (Figure 21), et ce, pour les trois shHNRNPA2B1 utilisés. De plus, le niveau du changement d'épissage favorisant le variant $\alpha 6A$ corrèle avec l'efficacité de l'inhibition du facteur d'épissage HNRNPA2B1 (shHNRNPA2B1-3). Ce résultat établit pour la première fois l'implication du facteur HNRNPA2B1 dans l'épissage alternatif de la sous-unité $\alpha 6$.

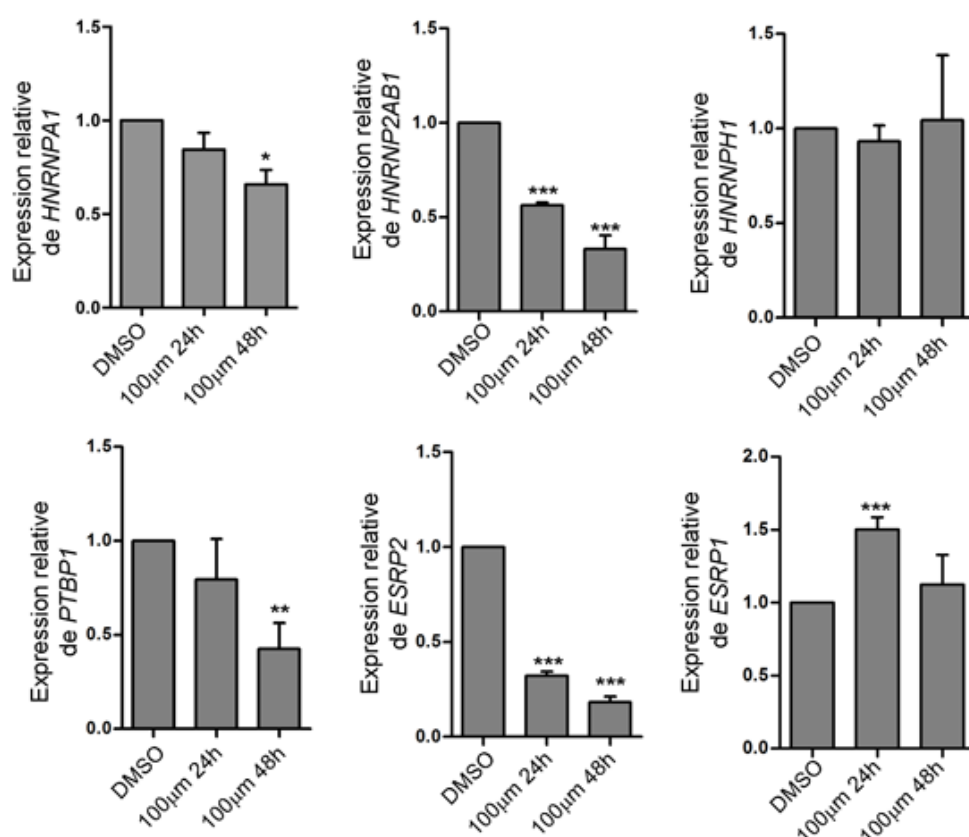


Figure 20 : L'inhibition de MYC entraîne la diminution de l'expression génique de différents facteurs d'épissage alternatif. Analyses par PCR quantitative des transcrits des gènes des facteurs d'épissage alternatif *HNRNPA1*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPH1*, *PTBP1*, *ESRP1* et *ESRP2* dans les cellules T84 traitées avec 100 μ M d'inhibiteur de MYC (10058-F4) pendant 24 h et 48 h. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence *RPLPO*. Test statistique ANOVA vs DMSO : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$. N=3.

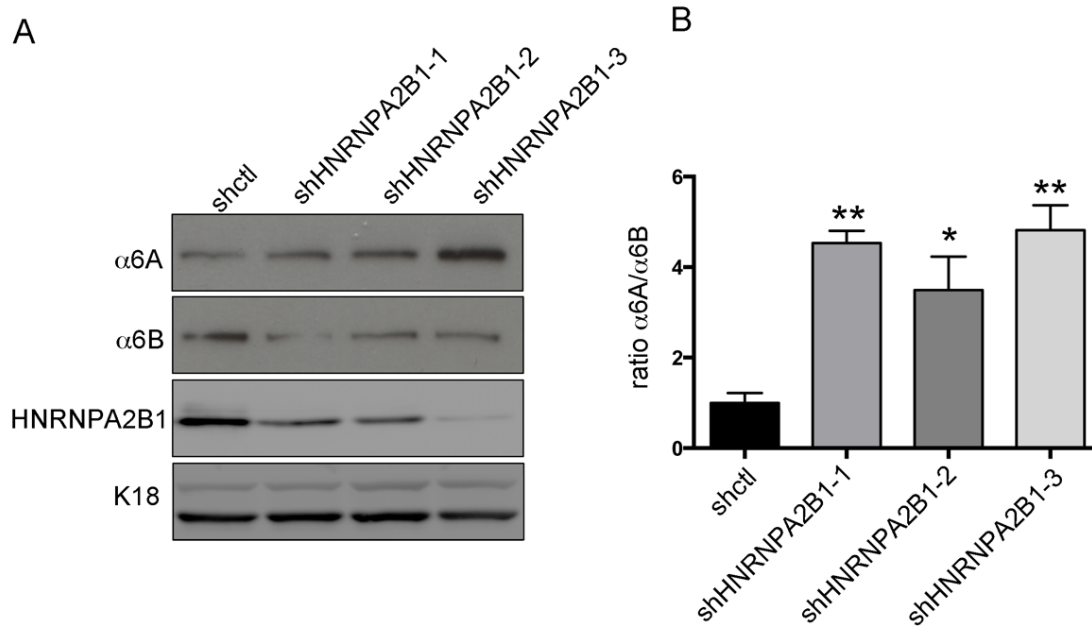


Figure 21 : L'abolition de l'expression du facteur HNRNPA2B1 favorise l'expression du variant $\alpha 6A$. (A) Immunobuvardages représentatifs pour la détection des variants $\alpha 6A/\alpha 6B$ et du facteur d'épissage HNRNPA2B1 dans les cellules T84 infectées avec un shARN contrôle (shctrl) et trois différents shARN ciblant le facteur d'épissage HNRNPA2B1 (shHNRNPA2B1). La cytokératine 18 (K18) est utilisée comme contrôle de quantité de protéines. n=3. (B) Graphiques de l'analyse densitométrique du ratio des niveaux protéiques des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$. Test statistique ANOVA vs shctrl. *= $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$. N=3.

4. DISCUSSION

4.1 L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans les cancers

Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont démontré que les récepteurs des intégrines possèdent des fonctions importantes dans plusieurs étapes de la progression du cancer telles que la survie, l'invasion, la migration et la prolifération cellulaire (Guo et Giancotti, 2004). Bien que les intégrines puissent être mutées, elles sont souvent surexprimées et activées de façon constitutive dans les cancers, comme pour l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans le cancer colorectal humain. La surexpression de la sous-unité $\alpha 6$ n'est pas limitée au cancer colorectal. Les cancers du sein (Wang *et al.*, 2011), de la prostate (Rabinovitz *et al.*, 1995) et le glioblastome (Gingras *et al.*, 1995) ont des niveaux élevés d'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ par rapport au tissu sain. De plus, l'expression d' $\alpha 6$ dans le cancer du sein corrèle avec une réduction de la survie des patientes (Friedrichs *et al.*, 1995). Toutefois, la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ est exprimée sous la forme de deux variants d'épissage alternatif, $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$, et ce, dans la plupart des tissus humains (Hogervorst *et al.*, 1993). Dans le côlon humain, le variant $\alpha 6B$ est détecté dans les cellules quiescentes et différenciées de la glande colique et de l'épithélium de surface, alors que le variant $\alpha 6A$ est associé aux cellules prolifératives à la base de la glande et aux cellules cancéreuses colorectales humaines (Dydenborg *et al.*, 2009b). Mes travaux de recherche ont permis de découvrir que l'augmentation de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ dans les tumeurs primaires colorectales humaines se faisait exclusivement aux dépens de son variant d'épissage alternatif $\alpha 6A$. Selon des études précédentes menées par le laboratoire du Pr Jean-François Beaulieu, la surexpression du variant $\alpha 6A$ augmente l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, tandis que la surexpression du variant $\alpha 6B$ provoque une réduction de l'activité transcriptionnelle de MYC et une baisse de la prolifération (Dydenborg *et al.*, 2009b; 2009a). Malgré le fait que ces études ont permis d'associer le variant $\alpha 6A$ à une modulation de la voie Wnt/ β -caténine, sa fonction biologique précise dans le cancer colorectal n'était pas encore identifiée. Ainsi, mes travaux ont permis d'établir la fonction proproliférative et protumorale du variant $\alpha 6A$ dans les cellules de cancer colorectal humain, en plus de confirmer son rôle dans l'activation de la voie Wnt/ β -

caténine et d'identifier son mécanisme d'action. L'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ représente un important médiateur de la migration et de l'invasion dans le cancer, principalement par la signalisation de la sous-unité intégrine $\beta 4$ (Mercurio *et al.*, 2004; 2001; Rabinovitz et Mercurio, 1996). La participation de la signalisation de la sous-unité intégrine $\alpha 6$, dans le rôle protumoral de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, demeure toutefois moins caractérisée. Néanmoins, des études ont démontré que la sous-unité intégrine $\alpha 6$ contrôle la prolifération cellulaire et la croissance tumorale dans le cancer du sein (Y. Wang *et al.*, 2011), le glioblastome (Lathia *et al.*, 2010) et le liposarcome humain (L. Wang *et al.*, 2011). Toutefois, l'implication des variants de la sous-unité $\alpha 6$ n'a été étudiée dans aucun de ces types de cancer. Mes travaux de recherche ont ainsi établi, pour la première fois, que la fonction protumorale et proproliférative de la sous-unité $\alpha 6$ est associée à son variant $\alpha 6A$. Plus particulièrement, la perte de $\alpha 6A$ dans les cellules de cancer colorectal réduit la prolifération et la tumorigenèse, et ce, même en présence du variant $\alpha 6B$. Cette découverte suggère que le variant $\alpha 6A$ pourrait être responsable la fonction proproliférative attribuée à la sous-unité $\alpha 6$ dans les cancers exprimant les deux variants, tels que le cancer du sein et le glioblastome (Hogervorst *et al.*, 1993; Lathia *et al.*, 2010; Y. Wang *et al.*, 2011). Considérant cela, il serait intéressant de vérifier si l'augmentation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ dans le cancer du sein et le glioblastome est le résultat d'une hausse spécifique du variant $\alpha 6A$, comme pour le cancer colorectal humain.

L'épissage alternatif est un processus par lequel les exons sont inclus ou exclus de l'ARN messager mature permettant d'augmenter considérablement la diversité des protéines. Mes travaux ont démontré que l'inclusion de l'exon 25 lors de l'épissage de l'ARN prémessager de la sous-unité $\alpha 6$ est favorisée, dans la majorité des cas de cancer colorectal, pour mener à la formation d'un variant avec une fonction proproliférative, soit le variant $\alpha 6A$. L'implication spécifique de l'épissage alternatif dans la formation d'un variant protumoral est également décrite pour plusieurs autres gènes. À titre d'exemple, le variant M2 de la pyruvate kinase se réexprime dans le glioblastome humain, conférant un avantage métabolique comparativement au variant M1 présent dans le tissu sain (David *et al.*, 2010). Le même phénomène s'observe pour le variant cycline D1b dans le cancer de l'œsophage, où son expression est fortement augmentée, favorisant la prolifération et la transformation

des cellules comparativement au variant cyclinD1a (Lu *et al.*, 2003). Ces études mettent en lumière comment un variant d'épissage peut avoir un effet distinct et prédominant par rapport à un autre variant, tel qu'observé dans mes travaux pour le variant $\alpha 6A$ par rapport à $\alpha 6B$. En fait, le variant $\alpha 6A$ possède un effet commun sur toutes les cellules de cancer colorectal même en présence du variant $\alpha 6B$, puisque les quatre lignées cellulaires de cancer colorectal testées ont révélé une diminution de l'entrée en phase S dans le cycle cellulaire suite à l'abolition du variant $\alpha 6A$. L'effet global sur les cellules vient du fait que son expression est augmentée dans la majorité des tumeurs primaires colorectales humaines. Les expériences *in vivo* ont aussi démontré une réduction de la croissance tumorale des xénogreffes pour deux des trois lignées testées, illustrant l'effet important du variant $\alpha 6A$ sur la tumorigenèse colorectale. Un résultat intéressant, les analyses subséquentes histologiques révèlent l'apparition de nécrose dans les cas des tumeurs issues des cellules DLD-1 exprimant le variant $\alpha 6A$. Cette observation peut expliquer en partie pourquoi l'effet de l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ sur la prolifération *in vitro* ne s'est pas transposé *in vivo* par une réduction du développement des tumeurs en xénogreffes. En ce sens, il serait important de répéter ces expériences avec un nombre moins élevé de cellules afin de permettre aux tumeurs contrôles de se développer moins rapidement et de prévenir le phénomène de nécrose. Ainsi, un nombre moins élevé de cellules pourrait permettre une vascularisation adéquate de la tumeur pour soutenir sa croissance. Toutefois, il n'est pas exclu que cette observation soit aussi causée par une modulation de facteurs proangiogéniques et proinflammatoires dans les cellules DLD-1 par l'abolition du variant $\alpha 6A$.

L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ lie toutes les laminines présentes dans la MEC (Beaulieu, 2010). Toutefois, plusieurs évidences suggèrent que la laminine $\alpha 3\beta 3\gamma 2$, l'un des ligands de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ serait impliquée dans la tumorigenèse colorectale (Lipscomb et Mercurio, 2005; Rabinovitz et Mercurio, 1996). Cela est supporté par le fait que l'expression de la chaîne $\gamma 2$ de la laminine $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ est augmentée dans la majorité des cas de cancer colorectal, corrélant avec un potentiel invasif élevé de cellules tumorales et une réduction de la survie des patients (Aoki *et al.*, 2002). Plusieurs études indépendantes ont confirmé ces observations, ce qui suggèrent un rôle important de l'interaction de la laminine $\alpha 3\beta 3\gamma 2$

avec ses récepteurs, tel que l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, dans la cancérogenèse colique humaine (Hlubek *et al.*, 2001; Lenander *et al.*, 2001; 2003; Shinto *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'expression de la chaîne $\gamma 2$ de la laminine $\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$ corrèle avec une accumulation nucléaire de la β -caténine (Hlubek *et al.*, 2001). En tenant compte de ces études, on peut proposer que la signalisation émergeant de l'interaction entre l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ avec la laminine $\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$ pourrait être responsable du contrôle de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine et de la prolifération cellulaire. Une telle affirmation reste cependant à être démontrée. Il est important de noter que l'abolition de la laminine $\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$ ne confirmerait pas la signalisation proproliférative générée par l'activation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, étant donné que l'interaction avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ serait également perturbée.

4.2 La régulation de la prolifération et de la voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine est reconnue pour être une voie dominante de la régulation de la prolifération cellulaire à la fois de l'épithélium intestinal physiologique et dans le cancer colorectal. Cela suggère une relation possible entre la fonction proproliférative de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cryptes du côlon normal et dans le cancer colorectal. Au sein des cellules normales de la glande colique, la voie Wnt/ β -caténine est modulée par la liaison des ligands WNT aux récepteur FRIZZLED ce qui permet la prolifération et l'homéostasie des cellules souches (Schuijers et Clevers, 2012). Dans le cancer colorectal, l'activation de la voie se réalise principalement par la mutation du gène *APC*, régulant la phosphorylation de la β -caténine et conséquemment favorisant son accumulation au noyau et l'activation des gènes cibles proprolifératifs. Les mutations dans le gène *APC* permettent une activation relative de la voie Wnt/ β -caténine menant à la formation de polypes (Powell *et al.*, 1992). Plusieurs autres événements agissent en synergie avec les mutations du gène *APC* pour augmenter l'activation de la voie Wnt/ β -caténine au cours de la progression du cancer colorectal, tels que la sécrétion des facteurs WNT (Voloshanenko *et al.*, 2013), l'inhibition de la GSK3 β par différentes voies de signalisation (Segditsas et Tomlinson, 2006) et la dégradation autophagique de DVL (Gao *et al.*, 2010). Tel que démontré par mes recherches, le variant $\alpha 6 A$ participe activement à cette hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer colorectal. En

utilisant plusieurs lignées cellulaires possédant différentes mutations dans le gène *APC*, l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ a eu un impact significatif sur plusieurs étapes de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, alors que l'inhibition de la GSK3 β a rétabli l'activité de la voie et l'impact sur ses gènes cibles. Ces observations démontrent que malgré les mutations dans le gène *APC*, la β -caténine peut toujours être régulée. En effet, une étude a établi qu'un certain nombre de mutations dans le gène *APC* permettrait le maintien de la capacité de régulation de la forme active de la β -caténine, confirmant ainsi mes observations (J. Yang *et al.*, 2006). Dans l'ensemble, mes travaux ont permis d'identifier un nouvel évènement dans la régulation de l'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer colorectal humain, soit l'augmentation du variant $\alpha 6A$. Étant donné le rôle majeur de la voie Wnt/ β -caténine dans la prolifération, cela suggère que l'effet exercé par le variant $\alpha 6A$ sur la prolifération dépend essentiellement de son impact sur cette voie de signalisation. Le fait que l'inhibition de la GSK3 β rétablisse l'activité de la voie et entraîne la réexpression des gènes cibles proprolifératifs supporte cette hypothèse. Toutefois, mes résultats ne prouvent pas de manière formelle que la fonction proproliférative du variant $\alpha 6A$ passe par la régulation de la voie Wnt/ β -caténine et de ses gènes cibles. Pour établir ce lien, on devrait également étudier l'impact du rétablissement de la voie Wnt/ β -caténine sur la prolifération cellulaire. De plus, les résultats issus la lignée cellulaire de cancer colorectal HT29 démontrent clairement que le variant $\alpha 6A$ peut réguler la prolifération cellulaire, la formation de tumeur en xénogreffe et la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β , sans affecter sa localisation nucléaire et son activité de transcription. Les expériences d'essais luciférase démontrent que les cellules HT29 exhibent une faible activation de la voie Wnt/ β -caténine et suggèrent que le variant $\alpha 6A$ pourrait réguler la fonction cellulaire indépendamment de la voie Wnt/ β -caténine canonique. La β -caténine peut être localisée dans le cytoplasme, dans le noyau et à la membrane associée avec la E-cadhérine. L'absence d'activité transcriptionnelle de la β -caténine en essai luciférase dans les HT29 pourrait être causée par l'inaccessibilité de celle-ci. Ceci est supporté par une étude qui a démontré que les niveaux d'activité de la voie dans les cellules HT29 sont très faible, car la β -caténine est exclusivement associée avec la E-cadhérine à la membrane plasmique (Q. Wang *et al.*, 2008). Cependant, nos analyses d'extrait nucléaire des cellules HT29 ont révélé la présence de β -caténine nucléaire. Cette observation pourrait être causée par le fait

que nous avons analysé des enrichissements nucléaires. Étant donné que la pureté des enrichissements nucléaires n'a pas été analysée, nous ne pouvons pas exclure que la β -caténine détectée provienne d'une contamination des fractions cytosolique et membranaire.

La voie Wnt/ β -caténine favorise la prolifération cellulaire par la régulation de différents gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ici, mes travaux ont permis de constater que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ contrôle les gènes cibles CCND2 et LGR5. Ces gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine sont également régulés à la hausse dans le cancer colorectal humain, supportant la fonction protumorale *in vivo* du variant $\alpha 6A$ (Mermelshtein *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2011). À la suite de la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine par des mutations du gène APC, la CCND2 est la première cycline augmentée et sa présence est indispensable pour la progression du cycle cellulaire et la tumorigenèse (Cole *et al.*, 2010). De plus, il a été rapporté qu'une expression élevée de LGR5 dans le cancer colorectal corrèle avec un faible pronostic de survie (Takahashi *et al.*, 2011). Il semble aussi que le récepteur LGR5 participe à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine par la liaison des R-spondine (de Lau *et al.*, 2014). Selon ces observations, l'inhibition de ces gènes cibles de Wnt/ β -caténine par l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ expliquerait la diminution de la prolifération cellulaire et la réduction de la formation de tumeurs *in vivo*. Néanmoins, l'expression de la CCND1 et de MYC n'est pas affectée par la perte du variant $\alpha 6A$ et par l'inhibition de la GSK3 β . Cela démontre que l'impact de la voie Wnt/ β -caténine est dépendante du type cellulaire et que dans le contexte du cancer colorectal humain, ce sont plutôt les gènes CCND2 et LGR5 qui sont impliqués.

L'expression de la sous-unité $\alpha 6$ est associée aux cellules souches cancéreuses. Plus précisément, la sous-unité $\alpha 6$ est essentielle pour maintenir l'autorenouvellement, la prolifération et la capacité à former des tumeurs des cellules souches du glioblastome, du cancer du sein et du liposarcome (Cariati *et al.*, 2008; Lathia *et al.*, 2010; L. Wang *et al.*, 2011). Il a récemment été rapporté que les cellules souches cancéreuses colorectales ont une forte activation de la voie Wnt/ β -caténine (Vermeulen *et al.*, 2010) et le gène LGR5 est un marqueur des cellules souches intestinales normales et du cancer colorectal humain (Barker *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent fortement que

l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est impliquée dans l'homéostasie des cellules souches cancéreuses, étant donné que le variant $\alpha 6A$ régule la voie Wnt/ β -caténine ainsi que l'expression du gène *LGR5*. En ce sens, il serait intéressant de vérifier si les résultats obtenus dans mes travaux en utilisant des lignées cellulaires de type clonogéniques s'appliquent aux cellules souches du cancer colorectal humain.

La progression d'un polype vers l'adénocarcinome implique plusieurs événements et mutations autres que la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine, telles que les mutations dans les gènes de la GTPase *KRAS* et de la kinase *BRAF* (Davies *et al.*, 2002), dans les gènes de *P53* (Cho et Vogelstein, 1992) et du *TGF- β* . Ces mutations affecteront différents processus cellulaires tels que l'apoptose, la migration/invasion et la prolifération cellulaire. Intéressamment, toutes les lignées testées dans mes travaux exhibent des mutations dans le gène *APC*, *P53* et les gènes de la GTPase *KRAS* ou de la kinase *BRAF*. À la lumière de mes résultats selon lesquels l'abolition du variant $\alpha 6A$ semblerait réguler l'activation de la GSK3 β , il est à se demander si la présence d'un *P53* sauvage ne pourrait pas changer la fonction du variant $\alpha 6A$. La GSK3 β peut réguler l'expression du gène de *P53* ainsi que la stabilité protéique de p53 pour induire l'apoptose (Jacobs *et al.*, 2012). Il serait intéressant d'analyser si, en présence d'un *P53* sauvage, l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ peut induire l'apoptose via la GSK3 β et *P53*. En ce sens, il n'est pas surprenant que l'abolition du variant $\alpha 6A$ n'induisse pas l'apoptose dans nos cellules, étant donné qu'elles expriment toutes un *P53* muté ou délété. Par ailleurs, nos résultats démontrent que le variant $\alpha 6A$ régule la phosphorylation de la β -caténine, indépendant des mutations dans le gène *APC*. Environ 10 % des tumeurs de cancer colorectal humain ont des mutations dans la région de phosphorylation par la GSK3 β dans le gène de la *CTNNB1*, favorisant la stabilité de la protéine (Sparks *et al.*, 1998). Il est donc possible que dans le contexte d'une mutation dans le gène *CTNNB1*, l'abolition du variant $\alpha 6A$ n'entraîne pas d'augmentation de la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β et conséquemment n'ait pas d'effet sur la prolifération cellulaire. Il serait très pertinent pour la poursuite de mes travaux d'analyser le rôle du variant $\alpha 6A$ dans un contexte de mutation dans le gène *CTNNB1*.

4.3 Le variant $\alpha 6A$ et la dégradation autophagique de DVL2

Les observations selon lesquelles la β -caténine active est réduite et l'inhibition de la GSK3 β rétablit l'activité de la voie Wnt/ β -caténine, démontrent que le variant $\alpha 6A$ interfère avec l'activité de la GSK3 β pour réguler la voie Wnt/ β -caténine. La protéine DVL, recrutée aux récepteurs FRIZZLED/LRP lors de l'activation de la voie par les ligands WNT, est le principal régulateur de la GSK3 β et du complexe de destruction dont elle bloque la formation (Angers et Moon, 2009). Conséquemment, mes travaux ont révélé que les niveaux protéiques de DVL2 sont réduits suite à l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$, appuyant l'hypothèse que le variant $\alpha 6A$ régule l'activité de la GSK3 β . De plus, l'inhibition pharmacologique de l'interaction de DVL avec le récepteur FRIZZLED dans les cellules qui exprime le variant $\alpha 6A$, provoque un ralentissement de la croissance cellulaire. Cela prouve pour la première fois l'importance physiologique de la réduction de DVL2 sur la croissance des cellules de cancer colorectal humain. L'absence d'effet additif entre l'abolition du variant $\alpha 6A$ et l'inhibition de DVL démontre également que le variant $\alpha 6A$ régule la croissance cellulaire par l'intermédiaire de DVL2. Par ailleurs, l'impact de la réduction de DVL2 sur la β -caténine active dans les cellules de cancer colorectal a déjà été démontré, confirmant l'implication fonctionnelle de la réduction de DVL2 par la perte du variant $\alpha 6A$ sur l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Jiang *et al.*, 2008).

Le fait que les niveaux de transcrit de DVL2 ne sont pas affectés, alors que l'expression protéique de DVL2 est réduite, révèle la présence d'un mécanisme de régulation post-traductionnel de DVL2 par le variant $\alpha 6A$. En ce sens, la dégradation de la protéine de DVL2 est régulée par l'autophagie sélective et par le protéasome (D. W. Chan *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). L'autophagie est le processus physiologique majeur de dégradation et de recyclage des protéines à longue vie, des composants cytosoliques et des organelles cellulaires endommagées comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes. Le processus débute par la formation d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, autour du matériel cytoplasmique ciblé, lequel fusionne avec le lysosome pour former l'autolysosome dans lequel sera dégradé le matériel cytoplasmique ciblé (Levine et Klionsky, 2004). Dans le mécanisme d'autophagie, la protéine P62 joue un

rôle crucial dans l'acheminement des protéines ubiquitinées spécifiques à l'autophagosome en formation. Il est démontré que p62 interagit avec les protéines ubiquitinées au niveau de son domaine UBA en C-terminal et forme des agrégats via son domaine N-terminal PB1 contenant celles-ci. Ces agrégats sont séquestrés dans l'autophagosome par l'interaction de p62 avec LC3 et dégradés dans l'autolysosome. Ce processus spécialisé de l'autophagie s'appelle autophagie sélective (Kraft *et al.*, 2010). Dans les cellules normales, l'autophagie et l'autophagie sélective sont des processus essentiels régulant les fonctions physiologiques (Wu *et al.*, 2013). Dans le cancer, l'autophagie peut agir comme un suppresseur de tumeur, ou comme un facteur protumoral favorisant la survie de la cellule tumorale et le développement du cancer (Mathew *et al.*, 2007; Z. J. Yang *et al.*, 2011). Dans le côlon, l'autophagie est active spécifiquement dans la région des cellules souches et progénitrices prolifératives, alors qu'elle est fortement active dans la majorité des tumeurs primaires de cancer colorectal et des lignées cellulaires *in vitro* (Groulx *et al.*, 2012). Ces observations suggèrent que l'autophagie serait bénéfique pour la survie et le développement des cellules du cancer colorectal humain (Yang et Winslet, 2011).

L'analyse de l'implication de l'autophagie durant mes travaux a mis en évidence un mécanisme insoupçonné régulé par le variant $\alpha 6A$, soit l'utilisation du processus de l'autophagie sélective pour contrôler la voie Wnt/ β -caténine. Plus précisément, mes résultats ont démontré qu'il contrôle la dégradation de DVL2 par l'autophagie sélective impliquant la protéine p62. L'implication de ce processus de dégradation est confirmée par les observations selon lesquelles l'inhibition de l'autophagie dans les cellules déficientes pour l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ est accompagnée d'un rétablissement des niveaux protéiques de DVL2. Cependant, cette augmentation de DVL n'est pas suivie d'un rétablissement de la forme active de la β -caténine. Cela s'explique, en partie, par les expériences d'immunofluorescences montrant que lors de l'inhibition du processus d'autophagie par la bafilomycine A1, la protéine DVL est toujours associée avec p62. Ce résultat suggère que dans ces conditions, ce sont les niveaux de la protéine DVL ubiquitinée et liée à p62 qui sont augmentés, et que cette forme est inapte à être recrutée aux récepteurs FRIZZLED afin d'inhiber la GSK3 β et conséquemment affecter la β -caténine active. Néanmoins, la stimulation de l'autophagie avec la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1, provoque une

réduction des niveaux de DVL2, accompagnée d'une réduction de la β -caténine active, validant ainsi l'impact de l'autophagie sur la voie Wnt/ β -caténine. Cependant, mes résultats ne montrent aucun changement des niveaux de LC3 – II suite à l'inhibition de mTORC1, suggérant l'absence d'induction de l'autophagie. Cette observation peut être expliquée par le fait que nous n'avons pas analysé le flux autophagique. En ce sens, l'absence de changement de LC3-II pourrait être causée par une dégradation de l'autophagosome toujours plus importante que sa formation dans nos cellules, malgré une stimulation par le traitement avec la rapamycine. En supposant que nous avons bel et bien stimulé le processus d'autophagie, mes résultats vont dans le même sens qu'une étude démontrant qu'en conditions de stress métabolique, l'autophagie régule la voie Wnt/ β -caténine par la dégradation de DVL2. Les auteurs de cette étude ont aussi confirmé l'importance fonctionnelle de ce mécanisme dans les cellules de cancer colorectal SW480, supportant mes observations réalisées dans plusieurs lignées cellulaires de cancer colorectal humain (Gao *et al.*, 2010). Toutefois, étant donnée que mTORC1 régule aussi la translation protéique, nous ne pouvons pas exclure que la baisse protéique de DVL2 que nous observons suite au traitement avec la rapamycine est causée par une réduction de sa synthèse protéique.

L'autophagie est un processus dynamique résultant de la formation de l'autophagosome, de la livraison de substrats de l'autophagie vers le lysosome et de la dégradation de substrats à l'intérieur de l'autolysosome. Ces différentes étapes sont régulées par plusieurs voies de signalisation, telles que la signalisation du complexe mTOR1 en réponse à un stress métabolique, la voie MERK/ERK et la voie PI3K/AKT (Levine et Klionsky, 2004). Le niveau d'activité du processus de l'autophagie, soit le flux autophagique, peut être quantifié par l'analyse de l'accumulation de LC3-II et p62 avec le temps, en réponse à l'inhibition de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome par le traitement à la bafilomycine A1 (Klionsky *et al.*, 2012). Tels que constatés suite au traitement avec la bafilomycine A1, les niveaux de LC3-II et de p62 sont comparables dans les cellules avec et sans le variant $\alpha 6A$, suggérant ainsi que le flux autophagique n'est pas influencé. Cette observation réalisée après 24 heures de traitement devra somme toute être confirmée avec un temps plus court de traitement, tel que 2 heures. Globalement, mes observations suggèrent que la réduction

de la protéine DVL2 n'est pas la conséquence d'une augmentation du flux autophagique, mais plutôt de l'augmentation de sa reconnaissance par p62. Cette reconnaissance s'effectue par l'ubiquitination de DVL2 par des complexes E3 ubiquitine ligases (Gao *et al.*, 2010). Certaines protéines déterminantes des complexes E3 ubiquitine ligases régulent l'ubiquitination et la dégradation de DVL, telles que pVHL (Gao *et al.*, 2010) dans la dégradation par le processus de l'autophagie et les protéines KLHL12-Cullin-3 (Angers *et al.*, 2006), NEDL1 (Miyazaki *et al.*, 2004) et PRICKLE1 (D. W. Chan *et al.*, 2006) dans la dégradation par le protéasome. Ces études ont identifié précisément l'implication de pVHL et PRICKLE1 dans le système gastro-intestinal. Mes travaux ont permis de constater que le mécanisme mis en place par la perte du variant $\alpha 6A$ ne passe pas par l'intermédiaire d'une régulation de VHL, mais possiblement par la régulation à la hausse de l'expression du transcrit et de la protéine de PRICKLE1. Peu de résultats sont connus concernant les motifs d'ubiquitinations permettant de diriger les molécules vers l'autophagie. Toutefois, il semble que peu importe le motif d'ubiquitination d'une protéine, l'autophagie et le protéasome la dégradent (Kraft *et al.*, 2010; Schreiber et Peter, 2014; Shaid *et al.*, 2013). L'augmentation de la protéine PRICKLE1 peut donc expliquer l'augmentation de la dégradation autophagique de DVL2 par la perte du variant $\alpha 6A$. L'abolition de PRICKLE1 par shARN en combinaison avec celle du variant $\alpha 6A$ permettrait de valider son rôle. Étant donné la similitude avec l'autophagie sélective, l'implication du protéasome dans la dégradation de DVL2 ne peut pas être exclue. Jusqu'à ce jour, peu de protéines sont caractérisées pour être régulées par l'autophagie sélective. Néanmoins, il a été démontré que P62 peut lier TRAF6 et la caspase-8, régulant respectivement la voie NF κ B (Duran *et al.*, 2008) et l'apoptose (Jin *et al.*, 2009). Considérant cela, il serait pertinent de vérifier si l'augmentation de PRICKLE1 régule d'autres protéines proprolifératives par l'autophagie sélective. Par ailleurs, la bafilomycine A1 agit en inhibant les pompes vacuolaires H⁺ATPase, empêchant l'acidification des organelles contenant des enzymes tels que les lysosomes et les endosomes (Klionsky *et al.*, 2012). Il a été démontré que la bafilomycine peut aussi inhiber le protéasome et d'autres processus cellulaires (Barth *et al.*, 2010). Étant donné que la bafilomycine A1 possède un large spectre d'action et peut aussi affecter le protéasome, il serait important de confirmer l'implication de l'autophagie dans le mécanisme d'action du variant $\alpha 6A$. Pour ce faire, l'inhibition de l'induction de

l'autophagosome ou l'inhibition de l'autophagie sélective pourrait être réalisée en utilisant des shARN dirigés contre BECLIN1 et p62 respectivement, combinée avec l'abolition du variant $\alpha 6A$. Néanmoins, combinées ensemble, les expériences avec la rapamycine, la bafilomycine et la colocalisation de DVL avec p62 supportent fortement l'implication de l'autophagie dans la régulation de DVL2 par le variant $\alpha 6A$.

À la lumière de mes travaux, le mécanisme de dégradation de DVL2 ne semble pas activé lorsque le variant $\alpha 6A$ est présent. D'un point de vue thérapeutique, cette observation est particulièrement intéressante. Le processus d'autophagie est fortement actif dans la majorité des cellules de cancer colorectal humain (Groulx *et al.*, 2012), conférant possiblement un avantage métabolique aux cellules cancéreuses pour favoriser leur survie et leur prolifération (Mathew *et al.*, 2007). Conséquemment, cette particularité pourrait être utilisée à leurs dépens pour dégrader la protéine DVL2 et ainsi empêcher la prolifération cellulaire, en ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$.

4.4 La signalisation intracellulaire du variant $\alpha 6A$

Le mécanisme exact par lequel la signalisation provenant du variant $\alpha 6A$ de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ régule la dégradation autophagique de DVL2 reste à déterminer. Néanmoins, la signalisation de l'extérieur vers l'intérieur découlant des intégrines se produit par le recrutement de différentes protéines d'échafaudage et de kinases sur leur domaine cytoplasmique. Par la suite, ces protéines intracellulaires régulent les fonctions physiologiques telles que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le métabolisme (Guo et Giancotti, 2004). Étant donné que les variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$ disposent de domaines cytoplasmiques différents, la fonction proproliférative du variant $\alpha 6A$ est nécessairement en lien avec sa capacité à recruter des partenaires cytoplasmiques spécifiques. Des études de doubles hybrides chez la levure démontrant que le variant $\alpha 6A$ interagit spécifiquement avec la protéine MSS4 et le variant $\alpha 6B$, avec la protéine BIN1, par le motif GFFKR de leur domaine cytoplasmique (Wixler *et al.*, 1999), appuient cette hypothèse. La protéine MSS4 induit l'apoptose des cellules de mélanomes A7 (Walter *et al.*, 2012), supportant le rôle protumotal du variant $\alpha 6A$. BIN1 est un suppresseur de tumeurs par sa

capacité à inhiber l'activité de transcription de MYC (Elliott *et al.*, 1999; Sakamuro *et al.*, 1996), suggérant un rôle de suppresseur de tumeurs pour le variant $\alpha 6B$. Les analyses de doubles hybrides chez la levure ont également révélé que le domaine PDZ de la protéine GIPC pouvait lier à la fois le domaine cytoplasmique des variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6B$. Toutefois, l'interaction est plus importante avec le variant $\alpha 6A$ (Mourabit *et al.*, 2002; Tani et Mercurio, 2001). L'association préférentielle de GIPC avec le variant $\alpha 6A$ pourrait être à l'origine du rôle proprolifératif du variant $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal, et ce, en considérant que les deux protéines colocalisent dans les cellules de cancer colorectal *in vitro* (Tani et Mercurio, 2001) et que plusieurs études indiquent que l'abolition de GIPC entraîne une réduction de la prolifération et de la tumorigenèse des cellules cancéreuses du sein (Choi *et al.*, 2010; L. Wang *et al.*, 2010) et du pancréas (Muders *et al.*, 2009). Le fait qu'il ait été établi initialement que la protéine DVL2 était dégradée par l'autophagie en condition de stress, plus précisément lors d'une déprivation en glucose (Gao *et al.*, 2010), suggère que l'abolition du variant $\alpha 6A$ pourrait affecter le métabolisme du glucose. Fait intéressant, la protéine GIPC lie la myosine VI par son domaine C-terminal et interagit avec le transporteur du glucose GLUT1 par son domaine PDZ pour l'acheminer à la membrane plasmique des cellules hématopoïétiques (Wieman *et al.*, 2009). Ce même domaine PDZ est également responsable de l'interaction avec la sous-unité $\alpha 6A$, ce qui empêche théoriquement l'association simultanée avec GLUT1 (Mourabit *et al.*, 2002; Tani et Mercurio, 2001). Cependant, la protéine GIPC s'homodimérise par ses domaines GH1 et GH2 pour produire un homodimère disposant de deux domaines PDZ (Katoh, 2013), permettant théoriquement l'association simultanée avec GLUT1 et le domaine cytoplasmique du variant $\alpha 6A$. Cela est supporté par le fait que le transporteur GLUT1 se localise au niveau de la membrane basolatérale des cellules polarisées Caco-2, comme l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Harris *et al.*, 1992). De plus, la protéine GLUT1 est absente de l'épithélium normal de la glande du colon, alors qu'on la détecte fortement dans 80 % des adénocarcinomes solides et des métastases de cancer colorectal humain (Jun *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2002). L'interaction GIPC et le variant $\alpha 6A$ pourrait favoriser le recrutement du transporteur GLUT1 à la surface de la membrane basolatérale, permettant ainsi le transport accru du glucose à l'intérieur de la cellule cancéreuse. Cette hypothèse pourrait ainsi expliquer l'augmentation de la dégradation autophagique de DVL2 suite à la

suppression du variant $\alpha 6A$. Dans la poursuite de mes travaux de recherche, il serait d'intérêt d'évaluer si l'abolition du variant $\alpha 6A$ s'accompagne d'une diminution du recrutement du transporteur GLUT1 à la membranaire et du transport du glucose intracellulaire. En somme, mes résultats ont établi que l'abolition de la signalisation émergeant du domaine cytoplasmique du variant $\alpha 6A$ et non celle du variant $\alpha 6B$ provoque une réduction de la prolifération associée à une diminution de la formation de tumeurs. Toutefois, l'identification et l'implication des protéines spécifiques interagissant avec le domaine cytoplasmique du variant $\alpha 6A$, dans le phénotype observé, restent à confirmer.

Conformément au mécanisme de biosynthèse et recyclage des intégrines (Bridgewater *et al.*, 2012), la sous-unité $\beta 4$ est réduite en l'absence du variant $\alpha 6A$. Dans ce cas, il se pourrait que la perte de la signalisation de la sous-unité $\beta 4$ cause la réduction de la prolifération et de la voie Wnt/ β -caténine. Néanmoins, les analyses en immunofluorescence et en immunobuvardage sur les fractions subcellulaires ont démontré que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ était toujours présente. Donc même si l'expression de la sous-unité $\beta 4$ est diminuée, elle existe toujours dans les cellules pour générer une signalisation intracellulaire. D'un point de vue fonctionnel, les résultats de mes travaux de thèse peuvent être associés spécifiquement à la signalisation du variant $\alpha 6A$ de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, et non, à celle de la sous-unité $\beta 4$. Malgré cela, la contribution de la sous-unité $\beta 4$ dans les observations ne peut pas être complètement exclue. Selon la littérature, la signalisation de la sous-unité $\beta 4$ est associée à la migration, l'invasion et l'apoptose, suggérant ainsi que les effets observés sur la voie Wnt/ β -caténine et la prolifération sont engendrées par la perte de la signalisation du variant $\alpha 6A$.

4.5 La régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ par MYC

Le proto-oncogène MYC est reconnu être fréquemment dérégulé dans le cancer colorectal (Ni *et al.*, 2005). À lui seul, MYC contrôle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différents processus favorisant la progression du cancer. Fait intéressant, la sous-unité $\beta 4$ est régulée positivement par MYC au niveau de son promoteur dans le cancer colorectal humain (Ni *et al.*, 2005). Selon mes travaux de doctorat, le promoteur de la sous-unité $\alpha 6$

est également sous le contrôle de MYC, menant à la surexpression spécifique de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans le cancer colorectal humain. Cependant, une étude a démontré que la surexpression de MYC inhibe l'étalement et l'adhérence des kératinocytes primaires lors de la stimulation par le TGF- β , par la répression des sous-unités intégrines $\alpha 6$, $\beta 1$ $\beta 4$, en collaboration avec MIZ-1 (Gebhardt *et al.*, 2006). Ces résultats diffèrent des observations obtenues dans le cancer colorectal humain. Cette différence peut s'expliquer par l'effet répresseur observé spécifique dans les kératinocytes suite au traitement par le TGF- β et, que dans ces conditions, l'association du complexe répresseur MYC/MAD/MIZ-1 au promoteur de la sous-unité $\alpha 6$ est favorisée. Toutefois, l'analyse de la séquence du promoteur de la sous-unité $\alpha 6$ a identifié un site fonctionnel pour la liaison MYC/MAD, situé à -345 avant le site de début de la transcription (Nishida *et al.*, 1997). Cette étude corrobore mes résultats établissant que la surexpression d'un dominant négatif de MYC (MADMYC) et l'inhibition pharmacologique de MYC réduit l'expression du promoteur du gène de la sous-unité $\alpha 6$. Le fait que la surexpression de MYC stimule le promoteur de la sous-unité $\alpha 6$ dans les cellules 293T, et non dans les cellules de cancer colorectal suppose également que dans ces cellules, le promoteur du gène de la sous-unité $\alpha 6$ est déjà occupé par le MC endogène. Ceci est supporté par le fait que les cellules utilisées expriment beaucoup plus la sous-unité $\alpha 6$ et MYC comparativement à une lignée cellulaire intestinale normale.. Globalement, mes observations démontrent que la fonction de MYC semble dépendre du contexte cancéreux des cellules et que dans le cancer colorectal humain, MYC active l'expression de la sous-unité $\alpha 6$. Ceci est également confirmé par la forte corrélation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$, démontrée dans mes travaux, et de la sous-unité intégrine $\beta 4$ avec MYC dans les tumeurs primaires de cancer colorectal humain (Ni *et al.*, 2005).

D'autre part, des études ont montré que la voie Raf-MEK-ERK pouvait aussi réguler l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 6$. L'activation constitutive de la voie Raf-MEK-ERK dans les NIH-3T3 ainsi que l'expression d'un mutant constitutif actif de MEK1 dans les cellules épithéliales intestinales de rat provoquent l'augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ (Lemieux *et al.*, 2009; Woods *et al.*, 2001). Malgré le fait que MYC est une cible importante de la voie Wnt/ β -caténine (Polakis, 2012), plusieurs études ont aussi établi

qu'il est également l'une des cibles principales de la voie Raf-MEK-ERK. En effet, l'activation de la voie Raf-MEK-ERK augmente l'expression de MYC par l'activation de son promoteur et par la phosphorylation de la protéine (Kress *et al.*, 2011; Marampon *et al.*, 2006). Dans le cancer colorectal, plusieurs mutations dans BRaf et Kras causent une forte activation de la voie (T. L. Chan *et al.*, 2003; Rustgi, 2007). Selon mes résultats, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine secondaire à l'abolition de l'expression du variant $\alpha 6A$ et l'inhibition de la GSK3 β n'affecte pas l'expression de MYC. Cela suggère fortement qu'une autre voie de signalisation serait principalement impliquée dans l'expression de MYC et la régulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ dans les cellules de cancer colorectal, possiblement la voie Raf-MEK-ERK.

4.6 MYC et l'épissage alternatif de l'exon 25 du transcrit de la sous-unité intégrine $\alpha 6$

En plus de contrôler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, MYC régule également l'expression de plusieurs facteurs d'épissage alternatif et conséquemment l'expression de variants d'épissage alternatif protumoraux dans le cancer. À titre d'exemple, MYC contrôle l'expression des facteurs d'épissage HNRNPA1, HNRNPA2B1 et PTBP1 pour la formation de variants possédant de nouvelles fonctions protumorales (David *et al.*, 2010; David et Manley, 2010). Mes recherches ont établi que MYC contrôle l'expression HNRPA2B1 dans le contexte du cancer colorectal, en plus d'identifier un nouveau facteur d'épissage régulé par MYC, soit ESRP2. Selon la séquence du promoteur du gène ESRP2, il contient un site potentiel de liaison de MYC/MAX (CACGTG). L'importance de cette séquence dans l'expression de ESRP2 n'est toutefois pas confirmée. Malgré cela, mes résultats suggèrent fortement que ESRP2 est une cible directe ou indirecte de MYC. Considérant que MYC, un important oncogène, est grandement augmenté dans le cancer colorectal, on devrait s'attendre à ce qu'ESRP2 et HNRPA2B1 soient impliqués dans l'expression de différents variants d'épissages protumoraux favorisant la progression du cancer. Mes travaux le confirment, car ils ont établi que MYC favorise l'inclusion de l'exon 25 dans l'ARN messager menant à la formation du variant proprolifératif $\alpha 6A$ dans le cancer colorectal humain, et ce, possiblement par les facteurs d'épissage ESRP2 et

HNRPA2B1. Un tel rôle dans l'expression de variants protumoraux est aussi connu pour ces deux facteurs d'épissage. Par exemple, le facteur HNRPA2B1 entraîne l'épissage alternatif de la pyruvate kinase M2 pour favoriser le métabolisme cellulaire (David *et al.*, 2010), il augmente l'inclusion de l'exon 12a dans le transcrit de BIN1 inactivant sa fonction suppresseur de tumeur et il active le proto-oncogène RON par l'exclusion de l'exon 11 (Golan-Gerstl *et al.*, 2011). De plus, HNRPA2B1 est surexprimé dans les glioblastomes humains et corrèle avec une faible survie des patients (David *et al.*, 2010; Golan-Gerstl *et al.*, 2011). Le facteur ESRP2 régule de nombreux variants d'épissage impliqués dans la transition épithéliale-mésenchyme tels que CD44, CTNND1 et ENAH (Warzecha *et al.*, 2010). Afin d'évaluer la participation de HNRPA2B1 dans l'épissage alternatif de l'exon 25 de sous-unité intégrine $\alpha 6$, son expression a été abolie. Contre toute attente, l'abolition de HNRPA2B1 a favorisé l'inclusion de l'exon 25, révélée par la hausse de l'expression du variant $\alpha 6A$ et une diminution du variant $\alpha 6B$. Ce résultat illustre la complexité du processus d'épissage alternatif dans la cellule, déterminé par la présence et la compétition entre les facteurs activateurs et répresseurs. Bien que ce résultat ne concorde pas avec les expériences d'inhibition de MYC, il correspond au rôle répresseur des facteurs de la famille des HNRNP (Matlin *et al.*, 2005). Ainsi, mes travaux ont permis de découvrir que le facteur HNRPA2B1 réprime l'utilisation du site aux extrémités de l'exon 25 du transcrit de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ pour favoriser la formation du variant $\alpha 6B$. Récemment, il a démontré que le facteur ESRP2 favorisait l'incorporation de l'exon 25 dans le transcrit mature de la sous-unité $\alpha 6$, corroborant une partie de mes résultats (Warzecha *et al.*, 2010). Toutefois, mes résultats révèlent un mécanisme beaucoup plus complexe, impliquant la participation d'un facteur d'épissage activateur, ESRP2, et d'un facteur d'épissage répresseur, HNRPA2B1. Le fait que les deux facteurs soient présents dans une cellule de cancer colorectal exprimant majoritairement le variant $\alpha 6A$, suggère que le facteur ESRP2 possède un effet dominant sur le rôle répresseur du facteur HNRPA2B1, permettant ainsi l'utilisation préférentielle des sites d'épissage de l'exon 25 en sa présence. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi l'inhibition de MYC entraîne une baisse du variant $\alpha 6A$. En se basant sur mes observations et la littérature, il serait déterminant de confirmer le rôle activateur du facteur ESRP2 pour

l'épissage de l'exon 25 du transcrit de la sous-unité $\alpha 6$ dans le contexte du cancer colorectal humain.

4.7 L'implication clinique

La signalisation émergeant du variant $\alpha 6A$ de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ exerce un effet majeur sur la prolifération des cellules de cancer colorectal *in vitro* et *in vivo*. Le fait que l'on retrouve cette intégrine significativement surexprimée, peu importe le stade et le grade de la tumeur, démontre le potentiel thérapeutique de cibler de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$. Toutefois, la grande similitude entre les variants $\alpha 6A$ et $\alpha 6AB$ peut rendre difficile l'établissement de stratégies thérapeutiques. Mes recherches démontrent que la fonction du variant $\alpha 6A$ passe par la régulation de la dégradation autophagique de DVL2 et que MYC contrôle son expression. En ce sens, il serait intéressant de cibler l'une des composantes qui régule son expression telle que MYC et ESRP2, ou encore l'une des composantes que ce variant régule tel DVL2 et l'autophagie pour l'élaboration d'un futur traitement. L'impact de l'inhibition pharmacologique de DVL sur la croissance des cellules tumorales *in vitro* va dans ce sens. Il serait également pertinent de vérifier cette observation dans un contexte *in vivo* pour valider le potentiel thérapeutique du ciblage de DVL2. Un fait intéressant, le dominant négatif de MYC, appelé OMOMYC, élimine les tumeurs du poumon chez la souris et est présentement en phase préclinique (Soucek *et al.*, 2013). Ainsi, dans une perspective thérapeutique, il serait peut-être plus intéressant et plus facile de cibler les éléments régulant l'expression de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ et les éléments participant à sa fonction protumorale.

Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par le cancer en Amérique du Nord. Toutefois, ce type de cancer est traitable lorsque détecté aux stades précoces. Différentes techniques ont été mises au point pour analyser le contenu (ARN, ADN et protéines) des fèces, et ce, dans le but précis de diagnostiquer la présence précoce du cancer colorectal. Lors du passage des fèces dans le tube digestif, les cellules épithéliales de la muqueuse sont exfoliées dans les fèces, principalement les cellules différenciées exprimant le variant $\alpha 6B$.

Toutefois, lorsqu'une tumeur est présente dans la muqueuse, c'est les cellules cancéreuses exprimant le variant $\alpha 6A$ qui sont exfoliées dans les fèces. Cette particularité pourrait être utilisée pour développer un test diagnostique. En fait, les découvertes issues de mes travaux de thèse et des travaux publiés précédemment par notre laboratoire ont permis l'obtention d'un brevet international pour étudier l'expression du variant $\alpha 6A$ à cette fin. Nous sommes actuellement en train d'évaluer le potentiel diagnostique clinique précoce du cancer colorectal par la détection du variant $\alpha 6A$ dans les fèces, étant donné qu'il est fortement surexprimé dans ce cancer, et ce peu importe le stade.

5. CONCLUSION

En somme, mes travaux de recherche de thèse ont mené à la caractérisation d'un variant proprolifératif de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ dans le cancer colorectal humain, soit le variant $\alpha 6A$. La première partie de mon expérimentation a démontré que l'augmentation de la sous-unité $\alpha 6$ dans les tumeurs primaires colorectales humaines est le résultat d'une surexpression sélective d' $\alpha 6A$. En effet, son expression est plus que doublée dans le cancer colorectal comparativement au tissu sain, alors que celle du variant $\alpha 6B$ n'est pas modulée. De plus, la surexpression du variant $\alpha 6A$ constitue un événement majeur dans la carcinogenèse colorectale, en raison de son maintien durant la progression du cancer colorectal.

La seconde partie de mes travaux concernait l'investigation du rôle biologique du variant $\alpha 6A$. L'utilisation de différentes techniques *in vitro* et *in vivo* a amené à découvrir qu'il est un important médiateur de la prolifération et de la tumorigenèse des cellules humaines de cancer colorectal. Cette fonction est montrée par la diminution d'incorporation de BrdU et l'absence d'apoptose dans les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$, alors que l'intégrine $\alpha 6B\beta 4$ est toujours présente. De plus, la réduction de la capacité à former des tumeurs chez la souris par les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ a validé son rôle protumoral *in vivo*. Ces travaux permettent de conclure que le variant $\alpha 6A$ possède une fonction proproliférative et protumorale dans le cancer colorectal humain.

La troisième partie de mes travaux de recherche visait à déterminer la voie de signalisation du variant $\alpha 6A$. Une première dans ce domaine, mes expériences ont permis de découvrir que le variant $\alpha 6A$ participe à l'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer colorectal humain. Cette découverte est appuyée par plusieurs évidences, entre autres, le fait qu'une réduction de la β -caténine active, de la β -caténine nucléaire et de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TFC4 accompagne la perte du variant $\alpha 6$. Deux gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine, contrôlés par le variant $\alpha 6A$, ont également été découverts, soit CCND2 et LGR5. L'étude mécanistique a permis de démontrer que le variant $\alpha 6A$ contrôle la voie Wnt/ β -caténine par la dégradation autophagique de DVL2. Ce

mécanisme s'opèrerait possiblement par la surexpression de PRICKLE1. Considérant que l'autophagie est un processus fortement actif dans le cancer colorectal, ce résultat introduit une avenue thérapeutique intéressante utilisant l'autophagie aux dépens des cellules cancéreuses.

Dans la dernière partie de mes travaux, l'étude du mécanisme de la surexpression du variant $\alpha 6A$ a permis de découvrir que le proto-oncogène MYC contrôle l'expression de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ dans le cancer colorectal humain. Les expériences de surexpression de MYC et d'un dominant négatif MADMYC ont confirmé que la liaison du complexe MYC/MAX dans les cellules de cancer colorectal humain active le promoteur de la sous-unité $\alpha 6$. L'inhibition pharmacologique de MYC supporte également cette observation. De plus, mes travaux ont identifié un mécanisme impliquant deux facteurs d'épissage alternatif régulés par MYC, ESRP2 et HNRNPA2B1. Ces facteurs participent à l'épissage de l'exon 25 dans le transcrit mature de la sous-unité $\alpha 6$, l'un activateur et l'autre répresseur, et favorise ensemble la présence du variant $\alpha 6A$. Ces résultats permettent de conclure que MYC régule l'expression du variant $\alpha 6A$ dans les cellules cancéreuses colorectales humaines.

Globalement, les résultats de mes travaux de recherche présentés dans cette thèse ont grandement contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine de la biologie cellulaire et du cancer. Ainsi, une nouvelle protéine proproliférative contrôlée par MYC dans le cancer colorectal a été découverte, soit le récepteur intégrine $\alpha 6A\beta 4$. Mes travaux permettent ainsi une meilleure compréhension du processus complexe de la carcinogenèse colorectale humaine et conduiront potentiellement à l'amélioration du traitement des patients. En ce sens, ces découvertes pourront mener à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques et à des tests diagnostiques plus efficaces et moins invasifs.

6. PERSPECTIVES

L'hypothèse et les objectifs proposés dans cette thèse ont été validés avec succès. Toutefois, mes travaux soulèvent d'autres interrogations qui mériteraient d'être élucidées. Par exemple, j'ai établi que le variant $\alpha 6A$ régule la prolifération et la voie Wnt/ β -caténine. Malgré le fait que cette voie soit reconnue pour être un médiateur important de la prolifération cellulaire, spécifiquement dans le cancer colorectal, il serait important de confirmer le lien entre sa réduction et la baisse de prolifération. Cela pourrait être déterminé par l'expression d'une forme mutée et non dégradable de la β -caténine et par son impact sur le rétablissement de la prolifération dans les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$. Tel que discuté précédemment, il serait intéressant de vérifier si l'augmentation de PRICKLE1 est liée à la dégradation de la protéine DVL2 par l'autophagie. Pour se faire, il suffirait de supprimer l'expression de PRICKLE1 par shARN et de quantifier la dégradation de DVL2 dans les cellules sh $\alpha 6A$. De plus, la participation possible de l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$ dans le transport du glucose mérite d'être étudiée davantage. Une technique simple permettant de prouver cette hypothèse serait d'utiliser un analogue fluorescent du glucose (2-NBDG) et de mesurer son internalisation dans les cellules exprimant ou non l'intégrine $\alpha 6A\beta 4$. Finalement, il serait pertinent de confirmer le rôle de ESRP2 dans l'épissage de l'exon 25 de la sous-unité $\alpha 6$, et ce, toujours dans le contexte du cancer colorectal humain. Cette expérimentation pourrait être réalisée en inhibant son expression par shARN. Pour répondre à l'hypothèse soulevée par mes résultats, à savoir que ESRP2 aurait un effet dominant sur HNRPA2B2, il serait également crucial d'effectuer l'abolition simultanée des deux facteurs et d'évaluer l'impact sur l'épissage de l'exon 25.

7. REMERCIEMENTS

Après avoir passé plusieurs années au sein de son laboratoire, je voudrais remercier mon directeur de thèse, Pr Jean-François Beaulieu pour la formation que tu m'as prodiguée, ton aide, tes conseils et ton support. Tu as été toujours disponible dans les moments heureux et difficiles. Malgré mon caractère et mes défauts, tu as toujours été derrière moi. Je n'oublierai jamais les fameux lab meeting au chalet du lac Stoke.

De plus, tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de Nuria Basora, Éric Tremblay et Elizabeth Herring, merci pour votre aide et vos conseils. Le laboratoire a été une deuxième famille et j'y ai côtoyé des gens qui sont devenus des bons amis. Merci aux chums du labo, Yannick Benoit, David Scooter Gagné, Frédéric Paré et Manon Lepage qui ont fait mon séjour au sein du laboratoire du Pr Jean-François Beaulieu une expérience des plus agréable et enrichissante. Je voudrai prendre aussi le temps de remercier les Pr Jacques Huot, Dr Sophie Rioux, Pr Fernand Pierre Gendron et Jean-François Beaulieu pour avoir accepté de siéger sur mon comité d'évaluation de thèse.

Finalement, je tiens à remercier l'amour de ma vie, Marie Bee, pour ton support, ton encouragement, ton amour inconditionnel et ta solidarité dans l'adversité du monde scientifique. De plus, un merci spécial à mes parents Suzelle Morin et Robert « Bob » Groulx pour votre support et votre aide durant toute la durée de mes études supérieures.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Angers, S., Moon, R.T., 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 468–477.
- Angers, S., Thorpe, C.J., Biechele, T.L., Goldenberg, S.J., Zheng, N., MacCoss, M.J., Moon, R.T., 2006. The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat. Cell Biol.* 8, 348–357.
- Aoki, S., Nakanishi, Y., Akimoto, S., Moriya, Y., Yoshimura, K., Kitajima, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., 2002. Prognostic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of 103 cases. *Dis. Colon Rectum* 45, 1520–1527.
- Babyatsky, M.W., Podolsky, D.K., 1999. Babyatsky: Growth and development of the gastrointestinal... - Google Scholar. Textbook of gastroenterology.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., Clevers, H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barth, S., Glick, D., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* 221, 117–124.
- Basora, N., Desloges, N., Chang, Q., Bouatrouss, Y., Gosselin, J., Poisson, J., Sheppard, D., Beaulieu, J.F., 1998. Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 75, 738–743.
- Basora, N., Herring-Gillam, F.E., Boudreau, F., Perreault, N., Pageot, L.P., Simoneau, M., Bouatrouss, Y., Beaulieu, J.F., 1999. Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J. Biol. Chem.* 274, 29819–29825.
- Beaulieu, J.-F., 2010. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ in colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol* 1, 3–11.
- Beaulieu, J.F., 1997. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31, 1–78.
- Beaulieu, J.F., 1999. Integrins and human intestinal cell functions. *Front. Biosci.* 4, D310–21.
- Benoit, Y.D., Groulx, J.-F., Gagné, D., Beaulieu, J.-F., 2012. RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *J Signal Transduct* 2012, 248759.
- Benoit, Y.D., Larrivée, J.-F., Groulx, J.-F., Stankova, J., Vachon, P.H., Beaulieu, J.-F., 2010. Integrin alpha8beta1 confers anoikis susceptibility to human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 434–439.
- Benoit, Y.D., Lussier, C., Ducharme, P.-A., Sivret, S., Schnapp, L.M., Basora, N., Beaulieu, J.-F., 2009. Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol. Cell* 101, 695–708.

- Bertotti, A., Comoglio, P.M., Trusolino, L., 2005. Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res.* 65, 10674–10679.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., 1993. Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 511–540.
- Black, D.L., 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 291–336.
- Bonomi, S., Gallo, S., Catillo, M., Pignataro, D., Biamonti, G., Ghigna, C., 2013. Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. *Int J Cell Biol* 2013, 962038–17.
- Borradori, L., Sonnenberg, A., 1996. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 647–656.
- Borradori, L., Sonnenberg, A., 1999. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* 112, 411–418.
- Boudjadi, S., Carrier, J.C., Beaulieu, J.-F., 2013. Integrin $\alpha 1$ subunit is up-regulated in colorectal cancer. *Biomark Res* 1, 16.
- Bridgewater, R.E., Norman, J.C., Caswell, P.T., 2012. Integrin trafficking at a glance. *J. Cell. Sci.* 125, 3695–3701.
- Cariati, M., Naderi, A., Brown, J.P., Smalley, M.J., Pinder, S.E., Caldas, C., Purushotham, A.D., 2008. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int. J. Cancer* 122, 298–304.
- Chan, D.W., Chan, C.-Y., Yam, J.W.P., Ching, Y.-P., Ng, I.O.L., 2006. Prickle-1 negatively regulates Wnt/beta-catenin pathway by promoting Dishevelled ubiquitination/degradation in liver cancer. *Gastroenterology* 131, 1218–1227.
- Chan, T.L., Zhao, W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Cancer Genome Project, 2003. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* 63, 4878–4881.
- Chao, C., Lotz, M.M., Clarke, A.C., Mercurio, A.M., 1996. A function for the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 56, 4811–4819.
- Cho, K.R., Vogelstein, B., 1992. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* 70, 1727–1731.
- Choi, J.S., Paek, A.R., Kim, S.Y., You, H.J., 2010. GIPC mediates the generation of reactive oxygen species and the regulation of cancer cell proliferation by insulin-like growth factor-1/IGF-1R signaling. *Cancer Lett.* 294, 254–263.
- Clark, E.A., Brugge, J.S., 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233–239.
- Cole, A.M., Myant, K., Reed, K.R., Ridgway, R.A., Athineos, D., Van den Brink, G.R., Muncan, V., Clevers, H., Clarke, A.R., Sicinski, P., Sansom, O.J., 2010. Cyclin D2-cyclin-dependent kinase 4/6 is required for efficient proliferation and tumorigenesis following Apc loss. *Cancer Res.* 70, 8149–8158.
- Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L., Bodmer, W.F., 1992. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 340, 626–630.
- Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., Li, F., 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–264.
- Dans, M., Gagnoux-Palacios, L., Blaikie, P., Klein, S., Mariotti, A., Giancotti, F.G., 2001.

- Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 1494–1502.
- Das, S., Anczuków, O., Akerman, M., Krainer, A.R., 2012. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell Rep* 1, 110–117.
- David, C.J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., Manley, J.L., 2010. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463, 364–368.
- David, C.J., Manley, J.L., 2010. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* 24, 2343–2364.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.
- de Krijger, I., Mekenkamp, L.J.M., Punt, C.J.A., Nagtegaal, I.D., 2011. MicroRNAs in colorectal cancer metastasis. *J. Pathol.* 224, 438–447.
- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., Clevers, H., 2014. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* 28, 305–316.
- de Melker, A.A., Sonnenberg, A., 1999. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *BioEssays* 21, 499–509.
- Dowling, J., Yu, Q.C., Fuchs, E., 1996. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* 134, 559–572.
- Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., 2008. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13, 343–354.
- Dydensborg, A.B., Teller, I.C., Basora, N., Groulx, J.-F., Auclair, J., Francoeur, C., Escaffit, F., Paré, F., Herring, E., Ménard, D., Beaulieu, J.-F., 2009a. Differential expression of the integrins alpha6Abeta4 and alpha6Bbeta4 along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Histochem. Cell Biol.* 131, 531–536.
- Dydensborg, A.B., Teller, I.C., Groulx, J.-F., Basora, N., Paré, F., Herring, E., Gauthier, R., Jean, D., Beaulieu, J.-F., 2009b. Integrin alpha6Bbeta4 inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity. *BMC Cancer* 9, 223.
- Eilers, M., Eisenman, R.N., 2008. Myc's broad reach. *Genes Dev.* 22, 2755–2766.
- Elliott, K., Sakamuro, D., Basu, A., Du, W., Wunner, W., Staller, P., Gaubatz, S., Zhang, H., Prochownik, E., Eilers, M., Prendergast, G.C., 1999. Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene* 18, 3564–3573.
- Fearon, E.R., 1995. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 768, 101–110.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

- Ferletta, M., Kikkawa, Y., Yu, H., Talts, J.F., Durbeej, M., Sonnenberg, A., Timpl, R., Campbell, K.P., Ekblom, P., Genersch, E., 2003. Opposing roles of integrin $\alpha 6 \beta 1$ and dystroglycan in laminin-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol. Biol. Cell* 14, 2088–2103.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R., 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027–1038.
- Fontao, L., Stutzmann, J., Gendry, P., Launay, J.F., 1999. Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 250, 298–312.
- Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H.J., Imhof, B.A., 1995. High expression level of $\alpha 6$ integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res.* 55, 901–906.
- Gagné, D., Groulx, J.-F., Benoit, Y.D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P.H., Beaulieu, J.-F., 2010. Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 222, 387–400.
- Gao, C., Cao, W., Bao, L., Zuo, W., Xie, G., Cai, T., Fu, W., Zhang, J., Wu, W., Zhang, X., Chen, Y.-G., 2010. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat. Cell Biol.* 12, 781–790.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsässer, H.-P., Eilers, M., 2006. Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J. Cell Biol.* 172, 139–149.
- Geiger, B., Yamada, K.M., 2011. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005033–a005033.
- Giancotti, F.G., 2003. A structural view of integrin activation and signaling. *Dev. Cell* 4, 149–151.
- Gingras, M.C., Roussel, E., Bruner, J.M., Branch, C.D., Moser, R.P., 1995. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* 57, 143–153.
- Goel, H.L., Gritsko, T., Pursell, B., Chang, C., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Norum, J.H., Toftgard, R., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., 2014. Regulated Splicing of the $\alpha 6$ Integrin Cytoplasmic Domain Determines the Fate of Breast Cancer Stem Cells. *Cell Rep* 7, 747–761.
- Golan-Gerstl, R., Cohen, M., Shilo, A., Suh, S.-S., Bakács, A., Coppola, L., Karni, R., 2011. Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma. *Cancer Res.* 71, 4464–4472.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N., 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 653–699.
- Green, K.J., Jones, J.C., 1996. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* 10, 871–881.
- Groulx, J.-F., Gagné, D., Benoit, Y.D., Martel, D., Basora, N., Beaulieu, J.-F., 2011. Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biol.* 30, 195–206.
- Groulx, J.-F., Giroux, V., Beauséjour, M., Boudjadi, S., Basora, N., Carrier, J.C., Beaulieu, J.-F., 2014. Integrin $\alpha 6$ A splice variant regulates proliferation and the Wnt/ β -catenin

- pathway in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* bgu006.
- Groulx, J.-F., Khalfaoui, T., Benoit, Y.D., Bernatchez, G., Carrier, J.C., Basora, N., Beaulieu, J.-F., 2012. Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy* 8, 893–902.
- Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., Couture, J., 1997. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 21, 233–300.
- Guanti, G., Resta, N., Simone, C., Cariola, F., Demma, I., Fiorente, P., Gentile, M., 2000. Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 283–287.
- Guo, W., Giancotti, F.G., 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826.
- Harris, D.S., Slot, J.W., Geuze, H.J., James, D.E., 1992. Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7556–7560.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.
- Hlubek, F., Jung, A., Kotzor, N., Kirchner, T., Brabletz, T., 2001. Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res.* 61, 8089–8093.
- Hogervorst, F., Admiraal, L.G., Niessen, C., Kuikman, I., Janssen, H., Daams, H., Sonnenberg, A., 1993. Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha 6 subunit. *J. Cell Biol.* 121, 179–191.
- Hogervorst, F., Kuikman, I., van Kessel, A.G., Sonnenberg, A., 1991. Molecular cloning of the human alpha 6 integrin subunit. Alternative splicing of alpha 6 mRNA and chromosomal localization of the alpha 6 and beta 4 genes. *Eur. J. Biochem.* 199, 425–433.
- Hynes, R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25.
- Jacobs, K. M., Bhave, S. R., Ferraro, D. J., Jaboin, J. J., Hallahan, D. E., & Thotala, D., 2012. GSK-3 β : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *International Journal of Cell Biology*, 2012(4), 930710–11.
- Jiang, X., Tan, J., Li, J., Kivimäe, S., Yang, X., Zhuang, L., Lee, P.L., Chan, M.T.W., Stanton, L.W., Liu, E.T., Cheyette, B.N.R., Yu, Q., 2008. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* 13, 529–541.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., Ashkenazi, A., 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137, 721–735.
- Jun, Y.J., Jang, S.M., Han, H.L., Lee, K.H., Jang, K.-S., Paik, S.S., 2011. Clinicopathologic significance of GLUT1 expression and its correlation with Apaf-1 in colorectal adenocarcinomas. *World J. Gastroenterol.* 17, 1866–1873.
- Katoh, M., 2013. Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Exp. Mol. Med.* 45, e26.
- Kimelman, D., Xu, W., 2006. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491.
- Klaus, A., Birchmeier, W., 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 387–398.

- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*.
- Kraft, C., Peter, M., Hofmann, K., 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* 12, 836–841.
- Kress, T.R., Cannell, I.G., Brenkman, A.B., Samans, B., Gaestel, M., Roepman, P., Burgering, B.M., Bushell, M., Rosenwald, A., Eilers, M., 2011. The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Mol. Cell* 41, 445–457.
- Lambert, D.W., Wood, I.S., Ellis, A., Shirazi-Beechey, S.P., 2002. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br. J. Cancer* 86, 1262–1269.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K et al., International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2010. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421–432.
- LeBleu, V.S., Macdonald, B., Kalluri, R., 2007. Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 232, 1121–1129.
- Lee, E.C., Lotz, M.M., Steele, G.D., Mercurio, A.M., 1992. The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J. Cell Biol.* 117, 671–678.
- Lemieux, E., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C., Rivard, N., 2009. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* 125, 1575–1586.
- Lenander, C., Habermann, J.K., Ost, A., Nilsson, B., Schimmelpenning, H., Tryggvason, K., Auer, G., 2001. Laminin-5 gamma 2 chain expression correlates with unfavorable prognosis in colon carcinomas. *Anal Cell Pathol* 22, 201–209.
- Lenander, C., Roblick, U.J., Habermann, J.K., Ost, A., Tryggvason, K., Auer, G., 2003. Laminin 5 gamma 2 chain expression: a marker of early invasiveness in colorectal adenomas. *MP, Mol. Pathol.* 56, 342–346.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2545–2550.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.
- Levine, B., Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Lipscomb, E.A., Mercurio, A.M., 2005. Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4integrin underlies its contribution to carcinoma progression. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 413–423.
- Liu, S., Cheng, C., 2013. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 547–566.
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- Lu, F., Gladden, A.B., Diehl, J.A., 2003. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res.* 63, 7056–7061.

- Lussier, C., Basora, N., Bouatrouss, Y., Beaulieu, J.F., 2000. Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc. Res. Tech.* 51, 169–178.
- Mainiero, F., Pepe, A., Yeon, M., Ren, Y., Giancotti, F.G., 1996. The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF. *J. Cell Biol.* 134, 241–253.
- Marampon, F., Ciccarelli, C., Zani, B.M., 2006. Down-regulation of c-Myc following MEK/ERK inhibition halts the expression of malignant phenotype in rhabdomyosarcoma and in non muscle-derived human tumors. *Mol. Cancer* 5, 31.
- Margadant, C., Frijns, E., Wilhelmsen, K., Sonnenberg, A., 2008. Regulation of hemidesmosome disassembly by growth factor receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 589–596.
- Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C., Sonnenberg, A., 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 607–614.
- Markowitz, S.D., Bertagnolli, M.M., 2009. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449–2460.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., White, E., 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 961–967.
- Matlin, A.J., Clark, F., Smith, C.W.J., 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 386–398.
- Mercurio, A.M., Bachelder, R.E., Bates, R.C., Chung, J., 2004. Autocrine signaling in carcinoma: VEGF and the alpha6beta4 integrin. *Semin. Cancer Biol.* 14, 115–122.
- Mercurio, A.M., Rabinovitz, I., Shaw, L.M., 2001. The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 541–545.
- Mermelshtein, A., Gerson, A., Walfisch, S., Delgado, B., Shechter-Maor, G., Delgado, J., Fich, A., Gheber, L., 2005. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *Br. J. Cancer* 93, 338–345.
- Ménard, D., Beaulieu, J.-F., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N., Vachon, P.H., 2006. *Gastrointestinal Tract, Cell signaling and* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Minchin, R.F., Kadlubar, F.F., Ilett, K.F., 1993. Role of acetylation in colorectal cancer. *Mutat. Res.* 290, 35–42.
- Miyazaki, K., Fujita, T., Ozaki, T., Kato, C., Kurose, Y., Sakamoto, M., Kato, S., Goto, T., Itoyama, Y., Aoki, M., Nakagawara, A., 2004. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279, 11327–11335.
- Mourabit, El, H., Poinat, P., Koster, J., Sondermann, H., Wixler, V., Wegener, E., Laplantine, E., Geerts, D., Georges-Labouesse, E., Sonnenberg, A., Aumailley, M., 2002. The PDZ domain of TIP-2/GIPC interacts with the C-terminus of the integrin alpha5 and alpha6 subunits. *Matrix Biol.* 21, 207–214.
- Muders, M.H., Vohra, P.K., Dutta, S.K., Wang, E., Ikeda, Y., Wang, L., Udugamasooriya, D.G., Memic, A., Rupasinghe, C.N., Rupasinghe, C.N., Baretton, G.B., Aust, D.E., Langer, S., Datta, K., Simons, M., Spaller, M.R., Mukhopadhyay, D., 2009. Targeting GIPC/synectin in pancreatic cancer inhibits tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 15, 4095–4103.
- Nagel, R., le Sage, C., Diosdado, B., van der Waal, M., Oude Vrielink, J.A.F., Bolijn, A., Meijer, G.A., Agami, R., 2008. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.* 68, 5795–5802.

- Ni, H., Dydensborg, A.B., Herring, F.E., Basora, N., Gagné, D., Vachon, P.H., Beaulieu, J.-F., 2005. Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression. *Oncogene* 24, 6820–6829.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M., Murphy, L.O., 2009. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* 136, 521–534.
- Nishida, K., Kitazawa, R., Mizuno, K., Maeda, S., Kitazawa, S., 1997. Identification of regulatory elements of human alpha 6 integrin subunit gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 258–263.
- Pal, S., Gupta, R., Davuluri, R.V., 2012. Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacol. Ther.* 136, 283–294.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., Blencowe, B.J., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40, 1413–1415.
- Perreault, N., Beaulieu, J.F., 1996. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* 224, 354–364.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Polakis, P., 2012. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008052.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Rabinovitz, I., Mercurio, A.M., 1996. The integrin alpha 6 beta 4 and the biology of carcinoma. *Biochem. Cell Biol.* 74, 811–821.
- Rabinovitz, I., Nagle, R.B., Cress, A.E., 1995. Integrin alpha 6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Metastasis* 13, 481–491.
- Rauch, J., Moran-Jones, K., Albrecht, V., Schwarzl, T., Hunter, K., Gires, O., Kolch, W., 2011. c-Myc regulates RNA splicing of the A-Raf kinase and its activation of the ERK pathway. *Cancer Res.* 71, 4664–4674.
- Rochlitz, C.F., Herrmann, R., de Kant, E., 1996. Overexpression and amplification of c-myc during progression of human colorectal cancer. *Oncology* 53, 448–454.
- Roussel, M.F., Davis, J.N., Cleveland, J.L., Ghysdael, J., Hiebert, S.W., 1994. Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. *Oncogene* 9, 405–415.
- Rowley, P.T., 2005. Inherited susceptibility to colorectal cancer. *Annu. Rev. Med.* 56, 539–554.
- Rustgi, A.K., 2007. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 21, 2525–2538.
- Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R., Prendergast, G.C., 1996. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* 14, 69–77.
- Santoro, M.M., Gaudino, G., Marchisio, P.C., 2003. The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. *Dev. Cell* 5, 257–271.
- Schreiber, A., Peter, M., 2014. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular Cell Research* 1843, 163–181.
- Schuijers, J., Clevers, H., 2012. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-

- spondins. *EMBO J.* 31, 2685–2696.
- Segditsas, S., Tomlinson, I., 2006. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531–7537.
- Seltana, A., Basora, N., Beaulieu, J.-F., 2010. Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen* 18, 114–122.
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I., 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20, 21–30.
- Shaw, L.M., 2001. Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the $\alpha 6 \beta 4$ integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5082–5093.
- Shaw, L.M., Mercurio, A.M., 1994. Regulation of cellular interactions with laminin by integrin cytoplasmic domains: the A and B structural variants of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin differentially modulate the adhesive strength, morphology, and migration of macrophages. *Mol. Biol. Cell* 5, 679–690.
- Shaw, L.M., Turner, C.E., Mercurio, A.M., 1995. The $\alpha 6 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 4$ integrin variants signal differences in the tyrosine phosphorylation of paxillin and other proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 23648–23652.
- Shinto, E., Tsuda, H., Ueno, H., Hashiguchi, Y., Hase, K., Tamai, S., Mochizuki, H., Inazawa, J., Matsubara, O., 2005. Prognostic implication of laminin-5 gamma 2 chain expression in the invasive front of colorectal cancers, disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. *Lab. Invest.* 85, 257–266.
- Simon-Assmann, P., Simo, P., Bouziges, F., Haffen, K., Kedinger, M., 1990. Synthesis of basement membrane proteins in the small intestine. *Digestion* 46 Suppl 2, 12–21.
- Soucek, L., Whitfield, J.R., Sodir, N.M., Massó-Vallés, D., Serrano, E., Karnezis, A.N., Swigart, L.B., Evan, G.I., 2013. Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes Dev.* 27, 504–513.
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1998. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 1130–1134.
- Sterk, L.M., Geuijen, C.A., Oomen, L.C., Calafat, J., Janssen, H., Sonnenberg, A., 2000. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin $\alpha 6 \beta 4$ and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J. Cell Biol.* 149, 969–982.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.-W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B., 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 36, 417–422.
- Takada, Y., Ye, X., Simon, S., 2007. The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.
- Takahashi, H., Ishii, H., Nishida, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., 2011. Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 1166–1174.
- Tani, T.T., Mercurio, A.M., 2001. PDZ interaction sites in integrin alpha subunits. T14853, TIP/GIPC binds to a type I recognition sequence in $\alpha 6 \beta 4$ and a novel sequence in $\alpha 6 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* 276, 36535–36542.
- Teller, I.C., Auclair, J., Herring, E., Gauthier, R., Ménard, D., Beaulieu, J.-F., 2007.

- Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev. Dyn.* 236, 1980–1990.
- Teller, I.C., Beaulieu, J.F., 2001. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 3, 1–18.
- Tetsu, O., McCormick, F., 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.
- Thomson, A.B.R., Drozdowski, L., Iordache, C., Thomson, B.K.A., Vermeire, S., Clandinin, M.T., Wild, G., 2003. Small bowel review: Normal physiology, part 2. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1565–1581.
- Timpl, R., 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 618–624.
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809.
- Ueno, H., Kajiwara, Y., Shimazaki, H., Shinto, E., Hashiguchi, Y., Nakanishi, K., Maekawa, K., Katsurada, Y., Nakamura, T., Mochizuki, H., Yamamoto, J., Hase, K., 2012. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 36, 193–201.
- Vachon, P.H., Beaulieu, J.F., 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103, 414–423.
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., Sprick, M.R., Kemper, K., Richel, D.J., Stassi, G., Medema, J.P., 2010. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 12, 468–476.
- Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T.D., Augustin, I., Metzger, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., Demir, K., Boehm, C., Leible, S., Ball, C.R., Glimm, H., Spang, R., Boutros, M., 2013. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nat Commun* 4, 2610.
- Wallingford, J.B., Habas, R., 2005. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421–4436.
- Walter, B.M., Nordhoff, C., Varga, G., Goncharenko, G., Schneider, S.W., Ludwig, S., Wixler, V., 2012. Mss4 protein is a regulator of stress response and apoptosis. *Cell Death Dis* 3, e297.
- Wang, J., Zhang, Z., Xu, K., Sun, X., Yang, G., Niu, W., Liu, E., Peng, C., Lin, P., Wang, J., Chen, R., Agrez, M., Niu, J., 2008. Suppression of integrin α 5 β 6 by RNA interference in colon cancer cells inhibits extracellular matrix degradation through the MAPK pathway. *Int. J. Cancer* 123, 1311–1317.
- Wang, L., Lau, J.S., Patra, C.R., Cao, Y., Bhattacharya, S., Dutta, S., Nandy, D., Wang, E., Rupasinghe, C.N., Vohra, P., Spaller, M.R., Mukhopadhyay, D., 2010. RGS-GAIP-interacting protein controls breast cancer progression. *Mol. Cancer Res.* 8, 1591–1600.
- Wang, L., Wang, L., Gu, Y., Shu, Y., Shen, Y., Xu, Q., 2011. Integrin α 6(high) cell population functions as an initiator in tumorigenesis and relapse of human liposarcoma. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2276–2286.
- Wang, Q., Sun, Z., Yang, H.-S., 2008. Downregulation of tumor suppressor Pcd4 promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1-dependent

- transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene* 27, 1527–1535.
- Wang, Y., Shenouda, S., Baranwal, S., Rathinam, R., Jain, P., Bao, L., Hazari, S., Dash, S., Alahari, S.K., 2011. Integrin subunits alpha5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis. *Mol. Cancer* 10, 84.
- Warzecha, C.C., Jiang, P., Amirikian, K., Dittmar, K.A., Lu, H., Shen, S., Guo, W., Xing, Y., Carstens, R.P., 2010. An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J.* 29, 3286–3300.
- Wei, J., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., 1998. Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by the cytoplasmic domain of the alpha6 integrin subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 5903–5907.
- Wieman, H.L., Horn, S.R., Jacobs, S.R., Altman, B.J., Kornbluth, S., Rathmell, J.C., 2009. An essential role for the Glut1 PDZ-binding motif in growth factor regulation of Glut1 degradation and trafficking. *Biochem. J.* 418, 345–367.
- Wiese, K.E., Walz, S., Eyss, von, B., Wolf, E., Athineos, D., Sansom, O., Eilers, M., 2013. The role of MIZ-1 in MYC-dependent tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a014290–a014290.
- Wixler, V., Laplantine, E., Geerts, D., Sonnenberg, A., Petersohn, D., Eckes, B., Paulsson, M., Aumailley, M., 1999. Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *FEBS Lett.* 445, 351–355.
- Woods, D., Cherwinski, H., Venetsanakos, E., Bhat, A., Gysin, S., Humbert, M., Bray, P.F., Saylor, V.L., McMahon, M., 2001. Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3192–3205.
- Wu, X., Won, H., Rubinshtein, D.C., 2013. Autophagy and mammalian development. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1489–1494.
- Yae, T., Tsuchihashi, K., Ishimoto, T., Motohara, T., Yoshikawa, M., Yoshida, G.J., Wada, T., Masuko, T., Mogushi, K., Tanaka, H., Osawa, T., Kanki, Y., Minami, T., Aburatani, H., Ohmura, M., Kubo, A., Suematsu, M., Takahashi, K., Saya, H., Nagano, O., 2012. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun* 3, 883.
- Yang, J., Zhang, W., Evans, P.M., Chen, X., He, X., Liu, C., 2006. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281, 17751–17757.
- Yang, S.Y., Winslet, M.C., 2011. Dual role of autophagy in colon cancer cell survival. *Ann. Surg. Oncol.* 18 Suppl 3, S239–239.
- Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., Sinicrope, F.A., 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1533–1541.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C.M., Nevins, J.R., Means, A.R., Sears, R., 2004. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 308–318.
- Yoon, S.-O., Shin, S., Mercurio, A.M., 2006. Ras stimulation of E2F activity and a consequent E2F regulation of integrin alpha6beta4 promote the invasion of breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 66, 6288–6295.
- Zhao, Y., Miao, G., Li, Y., Isaji, T., Gu, J., Li, J., Qi, R., 2014. MicroRNA 130b Suppresses

Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells through Downregulation of Integrin $\beta 1$. PLoS ONE 9,